



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la papaverina y la pentoxifilina en
la movilidad y en el influjo de calcio inducido
por la progesterona en el espermatozoide
humano.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

YADIRA LIBERTAD HERNÁNDEZ RUEDA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR: Dr. MARCO TULIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Septiembre, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Hernández
Rueda
Yadira Libertad
51147907
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
09914345-7

2. Datos del tutor

Dr.
Marco Tulio
González
Martínez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Elena
Calderón
Segura

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
María de los Ángeles
Aguilar
Santamaría

6. Datos del sinodal 4

Biól.
David Roberto
Chavira
Ramírez

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto de la papaverina y la pentoxifilina en la movilidad y en el influjo de calcio inducido por la progesterona en el espermatozoide humano.

44p.
2008

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Tulio González Martínez en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria.

Con apoyo económico de PAPIIT (beca IN213105) y CONACYT (beca 49517)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a toda la gente que hizo posible esta investigación gracias a su cooperación y ayuda tanto profesional como personal, a las cuales deseo mostrar mi más entrañable reconocimiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias, por hacerme sentir parte de algo sabio, bello y grande y porque es todo un orgullo ser de la UNAM.

A la memoria del Dr. Marco Tulio González Martínez, por la dirección de esta tesis, así como por su infinita paciencia, entusiasmo, estímulo y confianza, poniendo a mi alcance los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo, pero sobretodo por abrirme las puertas de su laboratorio, por el conocimiento transmitido. Mil gracias, dondequiera que se encuentre...

Al M. en C. Víctor Manuel Torres Flores por sus ideas, sugerencias, ayuda y apoyo incondicional, así como por todos los conocimientos transmitidos que facilitaron la realización de esta tesis, y que quedarán para mi desarrollo como profesionista; pero sobre todo por su amistad y su compañía inigualable.

Al Biól. David Roberto Chavira Ramírez, investigador del laboratorio de Hormonas esteroideas del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubiran; por facilitarme el acceso al equipo e instalaciones, por todo el material proporcionado para el desarrollo de la misma y por abrirme las puertas de su laboratorio. Por el tiempo brindado, su entera disponibilidad y colaboración prestada en el transcurso de este trabajo. Por su amistad, consejos, orientaciones profesionales, supervisión y apoyo incondicional, así como por su buen humor.

A la Dra. María Elena Calderón Segura y a la M. en C. María de los Ángeles Aguilar Santamaría por sus clases tan apasionadas, por todo el conocimiento transmitido,

pilar importante de mi formación como futura profesionalista y superación personal, por la atención proporcionada para la revisión de esta tesis, así como por sus sugerencias y aportaciones; sobre todo por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por formar parte de mi jurado, por la evaluación de este trabajo e inigualable experiencia.

A Giovani Picasso, por su gran apoyo y valiosa ayuda, así como por su agradable compañía en la realización de este trabajo, pero principalmente por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Kenell, Blanca y Francisco por su apoyo y sugerencias en el desarrollo de este trabajo de investigación. Gracias por su amistad.

Al Laboratorio Clínico y Biogenética Eugenio Sue, por la donación del sistema computarizado *Hamilton Thorne Motility Analyzer (HTM-IVOS v.12)*. (CASA), así como por su atención y conocimiento transmitido para el uso del equipo.

A los donadores por haber proporcionado amablemente el material biológico.

DEDICATORIA:

A mi familia a quien se los debo todo, especialmente a mis padres y a mis hermanos, que han confiado en mí desde el principio, me han apoyado y han hecho cosas por mí que siempre valoraré.

A mi papá Marco A. Hernández González y a mi mamá Leticia Rueda Ramos, por ser los pilares más importantes de mi vida, por cuidarme, confiar y apoyarme en lo que hago, por su fe y su cariño, por todo el esfuerzo tan grande para sostenerme en este maravilloso y apasionante mundo de la Biología (el cual ocupo algo más del tiempo pensado). Gracias por ser unos padres únicos e inigualables, por ser la fuente de inspiración en cada uno de los pasos que doy, por darme la vida y la oportunidad de disfrutar y aprender lo que hasta ahora he aprendido, no olvidando los valores que me enseñaron. Por todo esto y muchísimo más.... Gracias. Los amo!

A mi hermano Marco A. y a mí cuñada Catalina por su apoyo y consejos.

A Gwendoline Hernández, mi linda hermana (porque sin ti, nada sería igual), por cuidarme, preocuparse y quererme como ella solo sabe.

A mi sobrina Dulce Esmeralda, la cuál, con su alegría innata tiene la virtud de que cuando la miras cualquier problema parece empequeñecerse.

A Erick Amador, por su compañía, amistad, amor, paciencia, por su carácter emprendedor, ayuda y apoyo a lo largo de este trayecto. Por compartir grandes momentos de aventura y grandes emociones, por formar parte imprescindible de mi vida y ser fuente de inspiración. A toda su familia (Fran, Don Jorge, Celia, Adair y Jorge) por todo el apoyo brindado.

A todos mis amigos:

Ivonne Mar y Esmeralda Pérez, por su amistad incondicional y por su compañía desde el inicio de mi carrera, sobretodo por su ayuda y apoyo, consejos y maravillosos momentos en el campo, en las fiestas,..., etc.

Emma Cancino y Alma Martínez, por toda la ayuda proporcionada a lo largo de estos últimos años, por sus consejos, por su compañía de regreso a casa, tan invaluable y divertida, pero sobretodo por su amistad y cariño.

Gabriela P., Dafne V., Jonathan A. y Anuar L., por su presencia inigualable en mi vida, por todos esos consejos brindados, cariño, amistad, apoyo, ayuda, etc. ¡Gracias por ser y estar!

Alina Katia, Hugo T., Celia S., por el espíritu investigador, sabiduría vital y la chispa de alegría; por su continuo y constante apoyo, por todo el cariño brindado.

Laura Izquierdo, Rodrigo, Eric H., quienes me han aportado inolvidables momentos personales.

Susana, Dulce María, Mariana Rivas, Rosalinda, Bárbara Serrano, Miguel, Alberto y a todos aquellos que formaron parte de este viaje, por sus consejos y buenos deseos.

Luis por darme su cálida amistad y buen sentido del humor, tan necesarios en algún momento de desesperación, por su nobleza y caballerosidad, por los maravillosos conciertos de piano..., también a ti Jorge.

Juan, por haber tenido la inmensa suerte de contar con su amistad y espíritu fraternal; por esas palabras de aliento y sobretodo apoyo incondicional.

Quiero compartir con todos ustedes este logro, deseando que continuemos compartiendo nuestros tiempos, sueños y espacios. Mis entrañables amigos, quienes de

forma incondicional me han prestado su apoyo en los momentos difíciles, por ser mis consejeros y siempre encontrar soluciones a mis apuros.

Por los mil y un viajes de diversión, con una buena dosis de calma, paciencia y muchísima alegría.

Por que se que aun en la ausencia y detrás del muro silencioso que a veces nos separa, siempre podre contar con cada uno de ustedes.

De verdad, muchísimas gracias a todos.

La ciencia es algo serio pero con la que te la puedes pasar muy bien.

CONTENIDO

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
1.-Estructura del Espermatozoide.....	3
2.-Maduración del Espermatozoide.....	5
2.1.-Maduración en el epidídimo.....	5
2.2.-Maduración en el Tracto Genital Femenino.....	7
➤ Reacción Acrosomal.....	7
➤ Capacitación espermática.....	8
➤ Movilidad espermática.....	9
▪ Cuantificación de la movilidad espermática.....	11
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
V. MATERIALES Y MÉTODO	18
1.-Aislamiento de los espermatozoides e incubación con colorante de fluorescencia.....	18
2.-Determinación y calibración del Calcio intracelular.....	19
3.- Análisis de Movilidad.....	21
4.-Procedimiento para elevar el AMPc intracelular.....	21
5.- Análisis estadístico.....	22

VI. RESULTADOS	23
1.-Parámetros Cinemáticos del sistema CASA del espermatozoide en el reposo.....	23
2.-Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides analizados en CASA. Curvas dosis respuesta en CASA.....	24
3.-Efecto de la papaverina y la pentoxifilina en el aumento de Ca^{2+} inducido por la progesterona. Curva dosis-respuesta.....	31
VII. DISCUSIÓN	35
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. BIBLIOGRAFIA	40

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS.

Fig.1.- Esquema que muestra la morfología del espermatozoide humano.....	3
Fig.2.- Vía de señalización de la regulación de la movilidad espermática en mamíferos.....	9
Fig.3.- Parámetros de movilidad espermática.....	12
Fig.4.- Imagen tomada de Aitken y cols, 1998 en donde se muestra el efecto de 5 μ M de progesterona en ausencia o presencia de 5 mM de dbcAMP y 3 mM de pentoxifilina.....	15
Fig.5.- Registro de calibración para $[Ca^{2+}]_i$	20
Fig.6.- Inhibidores de PDE.....	22
Fig.7.- Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en el porcentaje de espermatozoides móviles.....	25
Fig.8.- Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los parámetros de velocidad espermática.....	27
Fig.9.- Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los índices de movilidad espermática.....	28
Fig.10.- Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en la amplitud lateral de la cabeza (ALH).....	29
Fig.11.- Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en la frecuencia de batido flagelar (BCF).....	30
Fig.12.- Efecto de la progesterona (P) en espermatozoides humanos tratados con dos inhibidores de fosfodiesterasas en la $[Ca^{2+}]_i$	32

Fig.13.- Influj o de calcio inducido por la progesterona en funci3n de la concentraci3n de pentoxifilina o papaverina.....	33
Fig.14.- Valores de $[Ca^{2+}]_i$ basal obtenidos despu3s de preincubar 5 minutos de pentoxifilina y papaverina.....	34
Tabla I.- Principales valores cinemáticos aportados por el Sistema CASA para describir la trayectoria de un espermatozoide.....	13
Tabla II.- Tratamientos aplicados a las muestras de semen.....	19
Tablas III.- Parámetros cinemáticos obtenidos por el sistema CASA en condiciones normales.....	24
Anexo A. Espermatobioscopías.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACs	Adenilato ciclasa soluble
AKAPs	Proteínas de anclaje a la cinasa A
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ALH	Amplitud de la dislocación lateral de la cabeza
ATP	Adenosín trifosfostato
BCF	Frecuencia del batido flagelar
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CaCl₂	Cloruro de calcio
CASA	<i>Computer assisted sperm analysis</i>
CNG	Canales de calcio dependientes de nucleótidos cíclicos
CatSper	Canal catiónico del espermatozoide
CCDV, Ca²⁺_v	Canal de calcio dependiente de voltaje
EGTA	Etilen glicol del ácido tetracético
ES	Error estándar
FD	Factores descapacitantes
HCl	Acido clorhídrico
HCO₃	Bicarbonato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-ácido etanosulfónico
HSM-H	Medio para espermatozoides humanos amortiguado con HEPES
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico
IP3	Inositol trifosfato
KCl	Cloruro de potasio
LIN	Linealidad
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
Na-lactato	Lactato de sodio
Na-piruvato	Piruvato de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato monosódico
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la salud
pH_b	pH basal

pH_i	pH intracelular
PAP	Papaverina
PDE	Fosfodiesterasa
PF	Pentoxifilina
PKA	Proteína Cinasa A dependiente de AMPc
PTK	Proteín-tirosina-cinasa
PTI	<i>Photon technology international</i>
RA	Reacción acrosomal
RIC	Reservas intracelulares de Ca ²⁺
STR	Rectitud
SWM	Medio de lavado espermático
TGF	Tracto Genital Femenino
TRP	<i>Transient receptor potential channel</i>
TRM	Tracto Reproductor Masculino
VCL	Velocidad curvilínea
VAP	Velocidad de la trayectoria media
VSL	Velocidad Rectilínea
ZP	Zona Pelúcida
ZP3	Glicoproteína 3 de la zona pelúcida

RESUMEN

Los espermatozoides requieren ser móviles progresivos para cumplir su principal objetivo, la fecundación, para lo cual es necesaria la presencia de ciertas moléculas o iones como son el AMPc y el Ca^{2+} , entre otras. El análisis de la movilidad espermática permite evaluar la capacidad fecundante de un individuo. Dicha capacidad se ve reflejada tanto en el porcentaje de espermatozoides móviles así como en los diferentes parámetros de movilidad que exhibe la trayectoria del espermatozoide. El uso de inhibidores de fosfodiesterasas (PDE), que evitan la degradación del AMPc ha sido una herramienta útil para inducir o estimular la movilidad en los espermatozoides humanos. Por otra parte, la progesterona induce una serie de efectos entre los que destaca la inducción de entrada de calcio, efecto que, de acuerdo a resultados obtenidos recientemente en el laboratorio, es estimulado por el inhibidor de la PDE papaverina, efecto que según otro reporte (*Aitken y cols, 1998*), no se presenta en espermatozoides incubados con pentoxifilina, un inhibidor de PDE ampliamente usado en la clínica. Dadas estas diferencias, en el presente trabajo se comparó el efecto de la papaverina y la pentoxifilina en los parámetros de movilidad y sobre la entrada de calcio inducida por progesterona en espermatozoides humanos no capacitados. Para tal efecto se incubaron espermatozoides de donadores sanos durante 5 minutos a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1 y 2 mM) de ambos inhibidores y se evaluó la movilidad en el sistema computarizado *Hamilton Thorne Motility Analyzer (HTM-IVOS v.12)* y el efecto en el influjo de calcio inducido por progesterona se evaluó mediante registros de fluorescencia en un espectrofluorómetro *PTI (Photon Technology International)*. Bajo estas condiciones se encontró que la papaverina produce estimulación de la movilidad espermática a bajas dosis, mientras que la pentoxifilina a altas dosis. Ambos fármacos estimularon la velocidad curvilínea, la velocidad de la trayectoria media y la velocidad rectilínea, siendo la pentoxifilina ligeramente más potente. Con la papaverina la rectitud y la linealidad disminuyen y la amplitud lateral de la cabeza se estimula. A diferencia de lo reportado por Aitken y cols (1998), la pentoxifilina estimuló el influjo de calcio inducido por progesterona, aunque en menor magnitud que la papaverina. Otra diferencia notable fue que la papaverina, pero no la pentoxifilina, aumentó los niveles de calcio intracelular en el reposo en el espermatozoide humano.

I. INTRODUCCIÓN

La reproducción es el proceso más importante que ha aparecido durante la historia de la vida, ya que mediante este proceso se producen nuevos individuos, transmitiendo el material genético de generación en generación, produciendo la variabilidad y a la vez manteniendo la continuidad de las especies y, por ende, la vida.

La variedad en los patrones de reproducción en los animales es enorme. La mayoría de los vertebrados se reproducen sexualmente, lo que implica la formación de células sexuales (gametos), generalmente por parte de dos progenitores diferentes (el macho y la hembra), que al unirse (fecundación) dan lugar a un cigoto, a partir del cual se formará un nuevo individuo. La formación de los gametos procede de una serie de transformaciones que ocurren en el evento conocido como gametogénesis, en donde ambos gametos se desarrollan por meiosis: proceso biológico que genera, a partir de una célula diploide, cuatro células haploides con características genéticas diferentes a las que les dio origen debido a la recombinación genética de los cromosomas homólogos. Este proceso se denomina **ovogénesis** en el caso de la generación del gameto femenino; y **espermatoogénesis** en el caso del gameto masculino; estos gametos están especializados en la producción y almacenamiento de nutrientes (óvulos) o en la movilidad, en el caso de los espermatozoides, tema central de esta tesis. Por lo que a continuación daré las características morfológicas que presentan los espermatozoides de mamífero y posteriormente abordaré la maduración espermática, requisito para el desarrollo de una movilidad vigorosa y progresiva, necesaria para que se de la fecundación (*Curtis y Barnes, 2001; Hickman y cols, 2000*).

1.-ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es el producto final de la gametogénesis, se caracteriza por presentar solamente la mitad de cromosomas de una célula somática; es decir, es una célula haploide; y es el portador de la información genética paterna. Presenta importantes variaciones tanto en forma como en tamaño entre las diferentes especies de mamíferos, pero en términos generales se compone por: una **cabeza**, y un **flagelo o cola** (Fig.1) (Gartner y Hiatt, 2002).

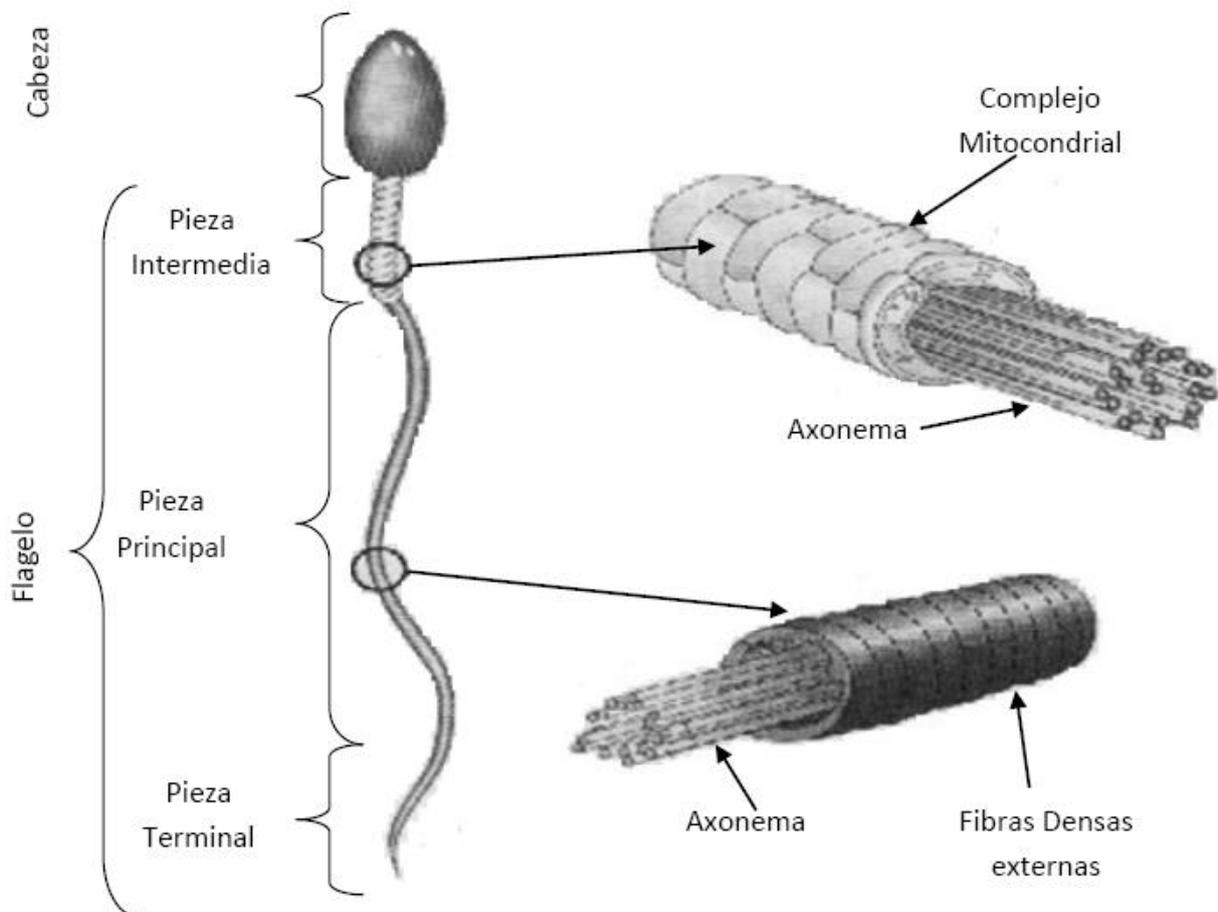


Fig.1. Esquema que muestra la morfología del espermatozoide humano (Modificado de Curtis y Barnes, 2001).

La morfología tan característica de los espermatozoides habla por sí misma de la función de cada una de sus partes, de tal forma que la principal función de la cabeza es la entrega de la información genética paterna dentro del ovocito, mientras que la de el flagelo es la de proporcionar a la célula movilidad que le va a permitir viajar en el Tracto Genital Femenino (TGF) y penetrar la zona Pelúcida (ZP) (Mortimer, 1997).

El **flagelo** consta de 4 regiones: **cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal**. Los componentes estructurales presentes en el flagelo son el **axonema, el complejo mitocondrial, la vaina fibrosa y las fibras densas externas** (*Oko y Clermont, 1990*).

El **axonema** se encuentra en el centro del flagelo y es la estructura responsable de la movilidad; contiene a la dineína, proteína responsable de convertir la energía química liberada mediante la hidrólisis del ATP en energía mecánica para la movilidad (*De Jonge y Barratt, 2006; Eckert, 1990; Mortimer, 1997*).

El **complejo mitocondrial** es el portador de enzimas oxidantes responsables de la fosforilación oxidativa, constituye la central de energía para la generación de ATP y se encuentra únicamente en la pieza intermedia (*Gartner y Hiatt, 2002; Oko y Clermont, 1990; Ruiz, 1988*).

La **vaina fibrosa** está compuesta por tres columnas longitudinales que van a correr a lo largo de la pieza principal. El 50% de las proteínas presentes en esta estructura van a ser las proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs) en algunas especies; y su fosforilación de tirosinas se cree que pudiera estar relacionada con su deslizamiento; también la presencia de enzimas glicolíticas (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa-S, hexoquinasa HK1-S, etc.) sostienen la importancia de esta estructura en la movilidad espermática; principalmente en la modulación del plano del batido flagelar (*De Jonge y Barratt, 2006*).

Otras estructuras presentes son **las fibras longitudinales densas externas** que a lo largo de la pieza media (en número de 9) y parte de la pieza principal (solo 7) van a rodear al axonema; estas estructuras van a estar compuestas por varios filamentos de proteínas ricos en cisteína, serina y prolina con alto grado de puentes disulfuro (S-S) dependientes de zinc (*De Jonge y Barratt, 2006; Álvarez, 2003; Mortimer, 1997*).

Como ya vimos, los espermatozoides son células genéticamente y morfológicamente diferenciadas (Fig.1), sin embargo, recién formados, todavía no poseen movimiento progresivo ni, mucho menos, están preparados para fusionarse con el ovocito, por lo que requieren de un proceso conocido como **maduración espermática** (*De Jonge, 2005; Visconti y Kopf, 1998*).

2.- MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La **maduración** espermática ha sido definida como el desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para fertilizar al ovocito (*Cooper, 2007*). La maduración espermática inicia en el epidídimo y termina en el tracto genital femenino (*Sullivan y cols, 2007; Breitbart, 2002*).

2.1. MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO

Los espermatozoides recién formados son incapaces de moverse, por lo que el epidídimo es el responsable del transporte de los espermatozoides, así como de su maduración, concentración y almacenamiento (*Sullivan y cols, 2007*).

El epidídimo es un tubo muy espiralizado (5-6 m. de longitud, en el caso del hombre) que forma parte del sistema de conductos extratesticulares del sistema reproductor masculino; se encuentra empaquetado en un saco de tejido conectivo, que es una extensión de la túnica albugínea; ubicado entre el conducto eferente y el conducto deferente; este último se comunica a su vez con la uretra, la cual desemboca en el exterior del cuerpo (*Gartner y Hiatt, 2002*).

Una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas llamadas factores estabilizantes del acrosoma o factores descapacitantes (FD), cuya función es evitar que se dé la reacción acrosomal (RA) en el tracto reproductor masculino (TRM), fenómeno que el espermatozoide cumple al tomar contacto con la zona pelúcida del ovocito (*Jones, 1998*).

Asimismo, en el epidídimo se completan cambios morfológicos en los espermatozoides en su tamaño y su forma, así como en la estructura interna del acrosoma y la migración de la gota citoplasmática desde una posición proximal hasta una posición distal en la pieza intermedia, y su posterior desprendimiento. Esta migración es diferente entre las distintas especies de mamíferos (*Álvarez, 2003*).

Las modificaciones bioquímicas que se presentan durante el tránsito a través del epidídimo son resultado de ciertas sustancias secretadas por las células del epitelio epidídimo (ácido siálico, carnitina, iones inorgánicos, etc.) (Jones, 1998); y se van a dar en todos los compartimentos celulares del espermatozoide: el acrosoma, el núcleo, el flagelo y la membrana plasmática; siendo este último el que experimenta más modificaciones, debido a la adición de proteínas, principalmente glicoproteínas. La composición lipídica de la membrana del espermatozoide varía durante éste tránsito: la cantidad de colesterol disminuye y aumenta la concentración de desmosterol y sulfato de colesterol; así como la composición de fosfolípidos y ácidos grasos (Álvarez, 2003).

La actividad metabólica de los espermatozoides también se ve modificada durante su trayecto por el epidídimo: se da una modificación en su actividad glicolítica y en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) como resultado de la actividad de la enzima adenilato-ciclasa y una disminución de la AMPc-fosfodiesterasa (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo durante este trayecto, sin embargo el movimiento empieza después de la eyaculación. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adquisición de la movilidad no son bien conocidos, sin embargo se han reportado ciertos reguladores o mediadores de la activación del axonema; entre los que se encuentran: FMP (*Forward Motility Protein*), glicoproteínas epidídimas y albumina, cartinina, AMPc, cambios en la composición fosfolipídica de la membrana. También se ha reportado un aumento en el grado de acidez intraespermático, que va de 6.2 en la cabeza a 6.8 en la cola; este cambio, al parecer favorece la fosforilación de la proteína dineína, y por ende la movilidad espermática (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

La maduración de los espermatozoides ocurre principalmente en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo para finalmente ser almacenados en la cola del mismo y a través de movimientos peristálticos y plasma seminal pasan por la uretra; para ser liberados al tracto genital femenino durante la eyaculación y a través de movimientos peristálticos y arrastre del plasma seminal pasan por el tracto y el pene para ser liberados al exterior por la eyaculación (De Jonge y Barratt, 2006).

2.2. MADURACIÓN EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO

Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos son depositados en la vagina y de aquí son transportados a través del cérvix hasta un pequeño orificio en el oviducto (trompas de Falopio), es decir, hasta la unión útero-tubal mediante la **movilidad activada** (ver más adelante) así como por las contracciones musculares de la vagina, cérvix y útero. La unión útero-tubal funge como una barrera para los espermatozoides, ya que sólo logran pasar aquellos que presentan una movilidad activada, es decir, de los miles que son depositados sólo unos cuantos pasan esta barrera. El oviducto consta de dos regiones: el istmo y el ámpula. Cuando el espermatozoide activado logra pasar al oviducto, se encuentran primero con el istmo, el cuál se conoce como el reservorio del oviducto, ya que los espermatozoides se fijan fuertemente al epitelio oviductual, quedando atrapados y formando un reservorio. Es en este sitio donde los espermatozoides son almacenados y poco a poco son **hiperactivados** y **capacitados** asincrónicamente (ya que es aquí donde se pierden los factores descapacitantes, ver más adelante), con lo que pierden afinidad por el epitelio y son liberados a la región del ámpula en donde se va a llevar a cabo el encuentro de un espermatozoide con un ovocito; para este momento el espermatozoide debe ser capaz de reconocer la capa extracelular del ovocito, la ZP y unirse a ella (*Eisenbach y Giojalas, 2006; Suarez y Pacey, 2006*). Se ha visto que los espermatozoides una vez capacitados e hiperactivados son guiados hacia el ovocito mediante secreciones de sustancias quimiotácticas de las células que lo rodean (*cumulus oophurus*), proceso conocido como quimiotaxis (*Eisenbach y Giojalas, 2006*).

La **hiperactivación** y la **capacitación** permiten al espermatozoide unirse a la zona pelúcida del óvulo, específicamente a la glicoproteína ZP3, que además induce la **RA**, proceso que permite al espermatozoide penetrar sus capas y fusionarse con el ovocito (*Darszon y cols, 2006; Turner, 2006; Suarez y Pacey, 2006*). Estos tres procesos son esenciales para que el espermatozoide fecunde al ovocito y los describiré brevemente a continuación.

➤ REACCIÓN ACROSOMAL

La RA es un fenómeno de exocitosis, en el que se da la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática de la región anterior de la cabeza del espermatozoide y se

caracteriza por la fusión de vesículas de estas membranas con la liberación del contenido acrosomal y exposición de la membrana acrosomal interna. Se lleva a cabo cuando el espermatozoide entra en contacto con la cubierta glicoproteica (con la proteína ZP3) del ovocito llamada ZP, y por la progesterona (*González-Martínez, 2002; Baldi y cols, 2000*).

La progesterona es una hormona esteroide presente en el líquido folicular y se ha demostrado que participa en la modulación de numerosos eventos en el espermatozoide humano, entre los que destacan la inducción de un aumento transitorio y rápido de calcio intracelular mediante la activación de receptores no genómicos (*Luconi y cols, 2005*), la inducción de la RA en espermatozoides capacitados (*Harper y cols, 2006*), la inducción de quimiotaxis (*Teves y cols, 2006*), la estimulación de la motilidad hiperactivada (*Uhler y cols, 1992*) y la estimulación de la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito (*FrancaVilla y cols, 2002*). Con base en estas observaciones se destaca la importancia de estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la progesterona en el espermatozoide humano.

➤ CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación consiste en una serie de modificaciones tanto bioquímicas como biofísicas que se dan en el espermatozoide en el ítsmo del TGF, para que se dé la RA (*Darszon y cols, 2006; Turner, 2006; Suarez y Pacey, 2005*).

Las vías de señalización solo han sido parcialmente definidas y lo que se sabe es que este proceso incluye una reorganización de la membrana plasmática, fosforilación de proteínas tirosina-cinasa, así como un incremento del pHi y $[Ca^{2+}]_i$, todos estos cambios preparan al espermatozoide para que pueda responder a la ZP y a la cobertura extracelular del ovocito para que se desencadene la RA (*Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Baldi y cols, 2000*).

Durante la capacitación también se presenta extrusión del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide que precede al ingreso de Ca^{2+} y bicarbonato (HCO_3^-) al citosol. Esto se debe al contenido rico en albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) del fluido oviductual. Estos dos componentes son capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide, lo que la hace más fluida y permeable, con lo que se altera el

transporte iónico incrementándose la concentración de estos iones ($[Ca^{2+}]_i$ y la $[HCO_3^-]_i$) en el citosol (Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006).

Se cree que la entrada de HCO_3^- puede estar mediada por un cotransportador Na^+/HCO_3^- o por difusión como dióxido de carbono, el ingreso de este ion activa una adenilato ciclasa soluble (ACs) exclusiva de estas células. Esta enzima por medio de ATP, produce AMPc, el que a su vez activa a la Proteína Cinasa A dependiente de AMPc (PKA); esta última induce, entre otros procesos, la activación tardía de una tirosina cinasa (PTK) que produce fosforilación de tirosinas en protein-tirosinas (Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006).

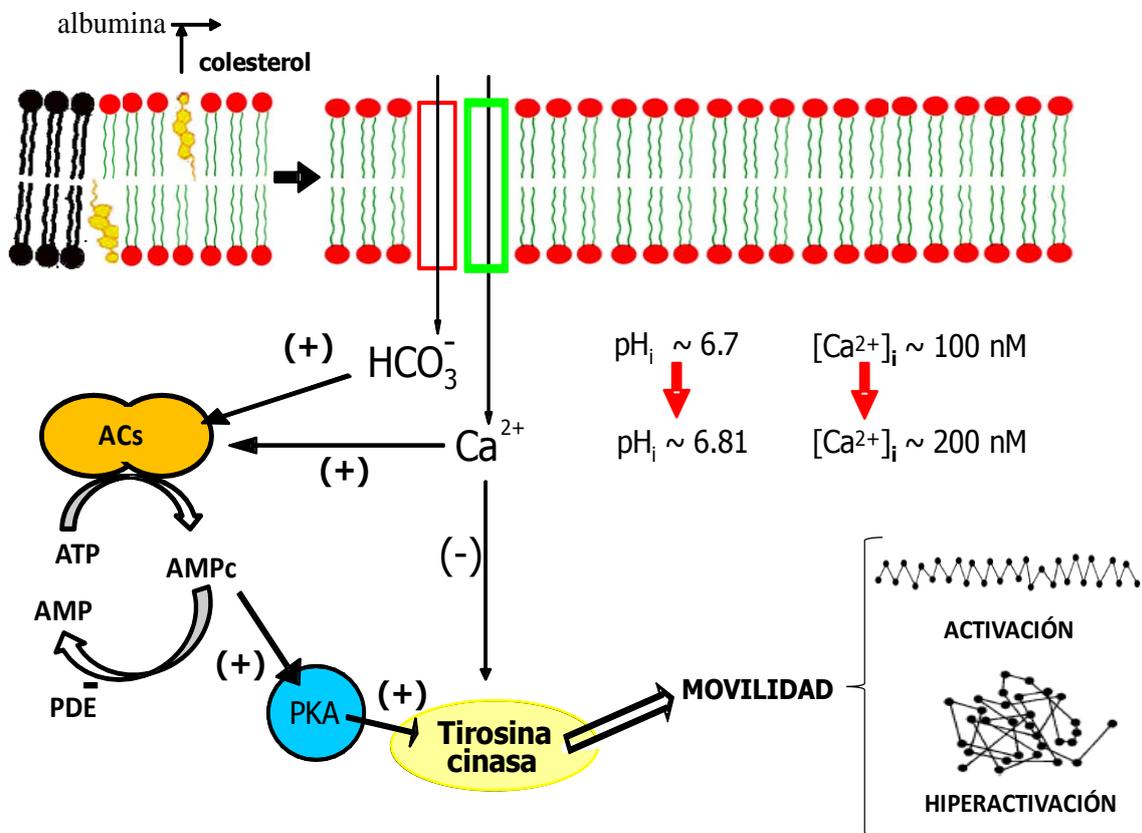


Fig.2. Representación esquemática de la vía de señalización que participa en la regulación de la movilidad espermática en mamíferos.

➤ MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

Los espermatozoides requieren ser móviles progresivos para poder cumplir su principal objetivo: la fecundación, para lo cual presentan dos formas de movilidad: **activación** e **hiperactivación** (Darszon y cols, 2006; Suarez, 1996).

Activación. Esta movilidad se refiere a una amplitud baja del batido flagelar que presentan los espermatozoides recién eyaculados; la activación les permite llegar al itsmo, donde son capturados.

Hiperactivación. Un espermatozoide hiperactivado se caracteriza por presentar un aumento en la amplitud del batido flagelar, originándose trayectorias con un mayor desplazamiento lateral de la cabeza, lo que lleva al desarrollo de movimientos asimétricos, no progresivos y vigorosos, en medios de cultivo no viscosos, mientras que en medios viscosos (como el del fluido folicular) este movimiento es rectilíneo y vigoroso; se cree que este tipo de movimiento le confiere la capacidad de liberarse del epitelio oviductual del itsmo y seguir progresivamente a lo largo de este tejido; mejora las posibilidades del contacto con el ovocito y la penetración del *cumulus oophorus* y en la zona de penetración (Darszon y cols, 2006; Jonge y Barratt, 2006; Suarez y Pacey, 2005; Mortimer, 2000; Suarez, 1996).

La activación y la hiperactivación utilizan mecanismos moleculares similares para generar el movimiento del flagelo cuyo eje funcional es el axonema y cuya proteína motora principal es la dineína (De Jonge y Barratt, 2006). Se ha reportado que la movilidad espermática de los mamíferos puede ser regulada por dos rutas de señalización AMPc/PKA y Ca^{2+} (Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006) (Fig.2). El AMPc, se incrementa por la activación de la ACs dependiente de HCO_3^- y por la inactivación de la fosfodiesterasa (PDE). El incremento de AMPc activa la PKA con lo que se induce la fosforilación de serina/treonina que a la larga, inducirían forforilación de tirosinas flagelares, probablemente a través de la activación de PTK con lo que se daría la **hiperactivación** del espermatozoide (Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006; Turner, 2006). La dineína es una de las proteínas blanco para PTK y su fosforilación parece ser de suma importancia para la iniciación de la movilidad flagelar, ya que su inhibición suprime la capacitación y la hiperactivación de la movilidad (Bajpai y Doncel, 2003). Por otra parte, el incremento de AMPc debido a la inhibición de fosfodiesterasas induce no solo la fosforilación de proteínas si no, además de la hiperactivación en espermatozoides normales (normozoospermicos), también en aquellos que presentan una deficiencia en la movilidad (astenozoospermicos), aspecto relevante en la clínica de fertilidad induce no solo la fosforilación de proteínas si no, además de la hiperactivación en espermatozoides normales tipo a, también en aquellos que

presentan una deficiencia en la movilidad B), aspecto relevante en la clínica de fertilidad (*Buffone y cols, 2005*).

La importancia del AMPc en la función espermática se pone de manifiesto (**a nivel laboratorio**) en el hecho de que se presenta infertilidad en ratones “knock out” para ACs, debido a defectos en la movilidad; y estos defectos son reversibles al tratarlos con un análogo permeable de AMPc (*Esposito y cols, 2004*), por esto se ha establecido que el AMPc actúa como una molécula señal para la regulación de la movilidad espermática.

El Ca^{2+} también se requiere para la movilidad espermática y proviene de calcio extracelular; el aporte de calcio de almacenes internos es poco claro. Tampoco se tiene completamente claro cómo afecta el incremento de este ion al flagelo. Los efectos que se han reportado tienen relación en el grado de asimetría flagelar característico de una movilidad hiperactivada, el Ca^{2+} actuaría directamente por medio de proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, lo que induce el movimiento asimétrico; sin embargo, altas concentraciones de este ion inhiben la movilidad flagelar. Este Ca^{2+} puede provenir, además del medio extracelular, de varias fuentes intracelulares como: las reservas intracelulares de Ca^{2+} (RIC) mediada por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), de la mitocondria o de la teca perinuclear (*Darszon y cols, 2006; De Jonge y Barratt, 2006*). El ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular ingresaría a través de canales iónicos.

En el flagelo se han reportado subunidades 1.2, 2.1 y 2.3 de canales dependientes de voltaje (Ca_v) (reportados en ratones); 3 subunidades de canales dependientes de voltaje (Ca_v3) tipo T (en ratones y humanos); canales TRP (en ratones y humanos); canales de calcio dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) y canales catiónicos específicos del espermatozoide (CatSper) (*Darszon y cols, 2006; Turner, 2006*). De estos canales, el CatSper es el que al parecer juega un papel central en el desarrollo de la hiperactivación. Su falta en ratones “knock out” produce ratones estériles incapaces de hiperactivarse, sin afectar movilidad activada, capacitación o reacción acrosomal. Estos canales se encuentran a lo largo del flagelo y son exclusivos de los espermatozoides de mamífero.

- **CUANTIFICACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.**

Como ya vimos, la movilidad espermática constituye uno de los parámetros fundamentales para valorar la calidad de una muestra seminal. La evaluación de esa calidad se basa en la

movilidad lineal y porcentaje de espermatozoides dotados de movimiento. Actualmente existen dos formas de evaluar la movilidad espermática, ya sea, subjetiva u objetivamente. La valoración subjetiva se realiza colocando la muestra de espermias sobre un portaobjetos o con una cámara de Makler y observando con un microscopio óptico; la estimación se hace directamente y el observador califica la movilidad mediante la siguiente clasificación según la OMS: A, movilidad lineal; B, movilidad curvilínea; C, movilidad *in situ* y D, inmóviles. La valoración objetiva se realiza mediante sistemas semiautomáticos y automáticos denominados genéricamente CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) mediante la adquisición de imágenes sucesivas que proporcionan la posición puntual de los espermatozoides en distintos tiempos y la unión de estos puntos origina trayectorias rectilíneas que definen el tipo de desplazamiento espermático. Existen diversos sistemas de análisis de imagen computarizado en el mercado y cada uno difiere en el método y algoritmos por los que se obtiene las características del movimiento espermático, razón por la cuál no se tiene una estandarización de valores normales para todos los CASA; en el presente trabajo se utilizó el *Hamilton Thorne Motility Analyzer*. Este tipo de valoración introduce precisión y datos cuantitativos sobre la cinética de los espermatozoides.

El sistema computarizado *Hamilton Thorne Motility Analyzer* se basa en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento mediante la identificación de la cabeza en un campo oscuro provenientes de un microscopio con contraste de fase (*Mortimer, 2000*).

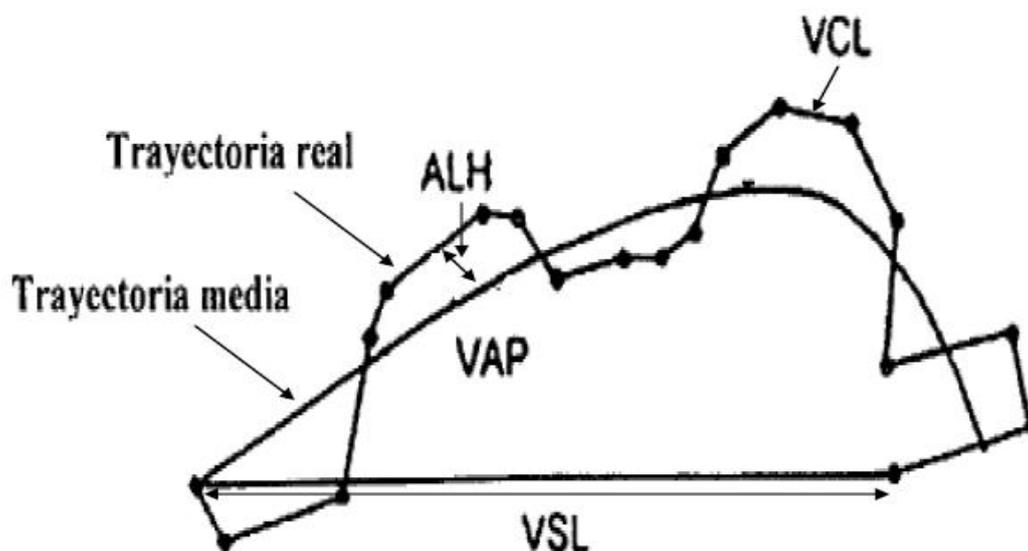


Fig.3. Parámetros de movilidad espermática. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad rectilínea. VAP: velocidad de la trayectoria media. ALH: amplitud lateral de la cabeza espermática.

En el análisis de movimiento referido a la cabeza espermática los principales valores cinemáticos que se evalúan a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides (Fig.3) se muestran en la siguiente tabla (Tabla I):

Parámetro	Unidad	Definición
Velocidad curvilínea (VCL)	µm/seg	Distancia que la cabeza del espermatozoide recorre en el periodo de la observación.
Velocidad Rectilínea (VSL)	µm/seg	Distancia en línea recta entre el primer y el último punto de la trayectoria.
Velocidad de la Trayectoria media (VAP)	µm/seg	Distancia que el espermatozoide ha viajado en la dirección del movimiento medio en el periodo de la observación.
Linealidad (LIN)	%	Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea. $(VSL/VCL)*100\%$
Rectitud (STR)	%	Indica la rectitud de la trayectoria media. $(VSL / VAP)*100\%$
Amplitud de la dislocación lateral de la cabeza (ALH)	µm	Anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide (Se calcula como la anchura total de la trayectoria principal).
Frecuencia del aleteo flagelar (BCF)	Hz	Indica el número de veces que la velocidad curvilínea cruza la trayectoria media

Tabla I. Principales valores cinemáticos aportados por el Sistema CASA para describir la trayectoria de un espermatozoide (Mortimer, 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el $[AMPc]_i$ y la consecuente activación de la PKA es una vía de señalización que regula la movilidad espermática, de aquí que se empleen fármacos con el fin de inducir o mejorar la movilidad espermática tanto *in vitro* como *in vivo*.

El uso de inhibidores de fosfodiesterasas (PDE), que evitan la degradación del AMPc y con ello mantienen altos sus niveles y la actividad de la PKA, ha sido una herramienta útil para estimular la movilidad en espermatozoides que presentan un porcentaje de movilidad (tipo A + tipo B) menor al 50% (astenozoospermia) o de aumentarla en aquellos que ya la presentan. En estudios previos realizados en el Laboratorio de Biomembranas del Depto. de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM, se observó que este efecto puede depender de el tipo de inhibidor de PDE, específicamente, la pentoxifilina (PF), un inhibidor ampliamente usado en la clínica, y la papaverina (PAP), un inhibidor que también estimula notablemente la movilidad espermática (Neri, 2007).

La PF es un fármaco del grupo metilxantina, es aplicado en las clínicas de reproducción asistida, como tratamiento de muestras astenozoospermicas (Buffone y cols., 2005). La acción de este fármaco no es muy clara, se sabe que incrementa la $[AMPc]_i$ en espermatozoides no capacitados provocando un cambio en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides, ya sea activándolos o hiperactivándolos (Nassar y col, 1999; Calogero y cols, 1998; Kay y cols, 1993; Hoskins y cols, 1975). Es importante señalar que el tiempo reportado para la incubación de espermatozoides con este fármaco es de 20 minutos a 4 horas. Por otra parte, la papaverina es un fármaco que pertenece al grupo de medicamentos llamados vasodilatadores, y también es un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas; se ha encontrado que tiene efecto en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides no capacitados, estimulando notablemente la movilidad (Neri, 2007; Hoskins y cols, 1975).

El análisis de movilidad espermática, hecho por Neri (2007), con base en una estimación directa visual y de acuerdo con los parámetros de la OMS, indicaron que la papaverina estimula la movilidad rectilínea y curvilínea (movilidad tipo A y B) de los espermatozoides humanos no

capacitados desde los 5 min de incubación en una concentración de 0.5 mM de papaverina. Este efecto resultó más potente que el de otros agentes que elevan el AMPc, como la pentoxifilina, aunque ésta se probó en concentraciones menores, a las usadas en la clínica. También reportó que la papaverina estimula notablemente la entrada de Ca^{2+} inducida por el voltaje y este efecto se asoció con un aumento de 4 veces el contenido de AMPc. A este respecto, en nuestro laboratorio se ha observado que la preincubación con papaverina también estimula notablemente la entrada de calcio inducida por la progesterona en el espermatozoide humano (Torres-Flores y cols, 2008). Este hecho nos llamó la atención ya que había un reporte que indicaba que la pentoxifilina, el otro inhibidor de la PDE, no afectaba la entrada de calcio inducida por la progesterona (Fig.3) (Aitken y cols, 1998) en tanto que en el laboratorio se observaban notables efectos estimuladores inducidos por la papaverina. En este sentido me pareció pertinente estudiar si estas diferencias en la respuesta a la progesterona en cuanto influjo de calcio podrían correlacionarse con sus efectos en la movilidad. Para ello en esta tesis compare el efecto de la pentoxifilina y la papaverina en los parámetros de movilidad en espermatozoides y en el influjo de calcio inducido por la progesterona en espermatozoides humanos.

Asimismo, en el presente estudio nos propusimos profundizar en el estudio de la movilidad de el espermatozoide e intentar establecer si, en efecto, la papaverina presenta ventajas sobre la pentoxifilina.

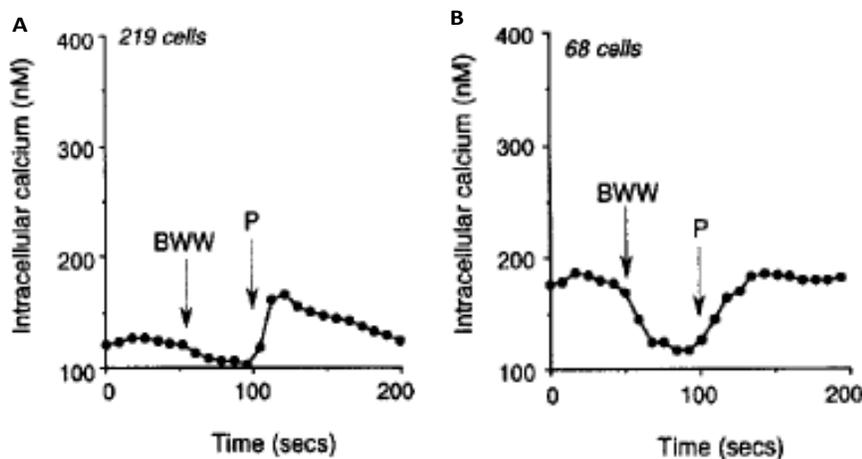


Fig.4. Imagen tomada de Aitken y cols, 1998 en donde se muestra A) Influxo de calcio inducido con 5 μM de progesterona y B) el efecto de la progesterona es suprimido en presencia de 5 mM de dbcAMP y 3 mM de pentoxifilina. Registros de microfluorescencia en células inmovilizadas en cubreobjetos.

III. HIPÓTESIS

- Si la papaverina y la pentoxifilina incrementan el AMPc se esperara que también aumenten los parámetros cinemáticos de los espermatozoides humanos aunque con diferente potencia.
- Si la pentoxifilina no afecta el influjo de calcio inducido por la progesterona y la papaverina sí, puede ser que estos efectos diferenciados puedan verse reflejados en cambios de la movilidad del espermatozoide.

IV. OBJETIVO

General:

- Estudiar el efecto de dos inhibidores de fosfodiesterasas en los parámetros cinemáticos en el espermatozoide humano no capacitados y sobre la entrada de calcio inducida por la progesterona.

Particulares:

- Comparar con base en curvas dosis-efecto, la actividad de la papaverina y la pentoxifilina sobre los parámetros de movilidad espermática por análisis de movilidad automatizada (CASA).
- Comparar el efecto de la papaverina y la pentoxifilina en la entrada de calcio inducida por la progesterona en espermatozoides humanos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Aislamiento de los espermatozoides e incubación con colorante de fluorescencia.

Se utilizaron 14 muestras de semen humano de 10 donadores sanos (ver Anexo A), entre los 22 y los 35 años de edad, 8 de ellas se emplearon para la cuantificación de calcio intracelular y 6 para cuantificar la movilidad espermática. Los donadores conocieron y firmaron una carta de consentimiento informado sobre el uso experimental de su muestra, autorizada por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, que a su vez sigue los lineamientos de la Convención de Helsinki sobre el correcto manejo de muestras provenientes de humanos.

Las muestras fueron seleccionadas según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud, es decir, con parámetros normales, de acuerdo con el siguiente criterio: concentración $\geq 20 \times 10^6$ M/ml; movilidad $> 50\%$ y con una morfología $>14\%$ de espermatozoides normales (*OMS, 2001*). Una vez colectada la muestra, se incubó entre los 15 y los 25 minutos a 37°C para su licuefacción (ver Anexo 1).

Con la finalidad de trabajar solo con los espermatozoides vivos, se realizó la separación de éstos del plasma seminal por centrifugación en un gradiente discontinuo de percoll isotónico a 75% y 50% (ambos gradientes amortiguados a pH 7.4 con HEPES 10 mM y NaCl 150 mM) por 20 minutos a 3500 rpm en tubos cónicos de 15 ml. Es importante destacar que el uso de percoll ha sido retirado en aplicaciones clínicas en humanos (*OMS, 2001*), sin embargo, su utilización es únicamente para fines de investigación (*Torres-Flores y cols, 2008; Buffone y col, 2005; Spehr y cols, 2004; González-Martínez y cols, 2002*).

Después de centrifugar la pastilla obtenida (espermatozoides) en la parte cónica fue separada y lavada también por centrifugación 5 minutos a 3500 rpm. Los espermatozoides se lavaron con medio HSM-H, cuya composición es: NaCl 17.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 0.49 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, Na-Piruvato 0.25 mM, Na-lactato 19 mM, Glucosa 2 mM y HEPES 25 mM, ajustado a pH 7.6 con NaOH.

Las células de cada uno de los 8 donadores se recuperaron en 1 ml de medio HSM-H y fueron incubadas 40 minutos a 37°C en 2 µM del indicador óptico acetoximetilado, fura-ff (Invitrogen, Molecular Probes), después fueron llevadas a 5 ml de HSM-H y centrifugadas 5 minutos a 3500 rpm para lavar el excedente del indicador y posteriormente determinar la $[Ca^{2+}]_i$ a través de registros de fluorescencia.

2.-Determinación y calibración del calcio intracelular.

Una vez que se les quitó el excedente del indicador óptico, al botón de células obtenido de cada donador se añadió 1800 µl de medio SWM (por sus siglas en inglés, *Sperm Washing Medium*) (CaCl₂ 2 mM, Glucosa 2.5 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, MgSO₄ 0.2 mM, NaCl 100 mM, NaHCO₃ 25 mM, Na-lactato 18.5 mM, Na-Piruvato 0.3 mM, HEPES 21 mM, rojo de fenol 2 mg/l, suplementado con 5 mg/l de albumina humana) (Irvine Scientific. Santa Ana California. Catalogo #9983) y se formaron 9 alícuotas de 200 µl cada una para la aplicación de los siguientes tratamientos:

ESPERMATOZOIDES + Medio SWM	PAPAVERINA	PENTOXIFILINA	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Alícuota 1	-	-	5 min.
Alícuota 2	0.25 mM	-	5 min.
Alícuota 3	-	0.25 mM	5 min.
Alícuota 4	0.5 mM	-	5 min.
Alícuota 5	-	0.5 mM	5 min.
Alícuota 6	1 mM	-	5 min.
Alícuota 7	-	1 mM	5 min.
Alícuota 8	2 mM	-	5 min.
Alícuota 9	-	2 mM	5 min.

Tabla II. Tratamientos aplicados a las muestras de semen (divididas en 9 alícuotas). Las muestras se incubaron a 37°C y el análisis completo se realizó alrededor de los 60 minutos.

Una vez aplicados los tratamientos, se añadió 1 ml de HSM-H a las alícuotas, se centrifugaron por 3 minutos a 3500 rpm y el botón celular se transfirió a la celda de

fluorescencia, conteniendo 2.5 ml de medio HSM-H con agitación magnética continua y termostatzada a 37°C; se estimularon con 4 μM de progesterona. El experimento se llevo a cabo aproximadamente en 60 min.

La fluorescencia se cuantificó con un espectrofluorómetro PTI (*Photon Technology International*) usando un filtro de 488 nm y se excitó alternadamente a 340 y 380 nm con el monocromador de PTI.

Los registros de Ca²⁺ se calibraron, como se muestra en la figura 5 añadiendo 5 μM de ionomicina, que permeabiliza la célula a Ca²⁺ y satura el fura, con lo que se obtuvo la relación 340/380 nm máxima (Rmax); posteriormente se queló el Ca²⁺ con 3.5 M EGTA + 1 % Tritón X-100 para obtener la relación 340/380nm sin Ca²⁺ (Rmin). Los valores de R a lo largo del registro, se convirtieron a valores de Ca²⁺ intracelular con la ecuación descrita por Grynkiewicz (*Grynkiewicz y cols, 1985*):

$$[Ca^{2+}]_i = kd(R - R_{min}) / (R_{max} - R) \beta$$

en donde $\beta = (F_{f380}/F_{b380})$, esto es, la relación de fluorescencias detectadas excityo a 380 nm en medio sin Ca²⁺ (EGTA-tritón) y con Ca²⁺ (ionomicina), respectivamente (Fig.4). La Kd que es la constante de disociación, para el fura ff es 5.5 μM (*Neri-Vidaurre y cols, 2006*).

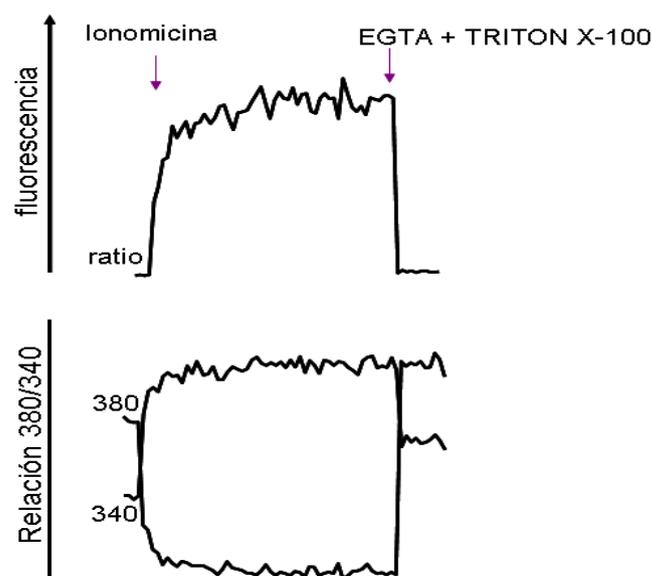


Fig.5. Registro de calibración para $[Ca^{2+}]_i$.

3.-Análisis de movilidad.

Una vez que se separaron los espermatozoides del plasma seminal de 6 donadores, se lavaron, y la pastilla obtenida (espermatozoides) en la parte cónica del tubo de 15 ml, se resuspendió en 1800 μ l de medio SWM. La muestra se dividió en 9 alícuotas de 200 μ l colocadas en tubos cónicos de 15 ml, para aplicar los tratamientos que se muestran en la Tabla II.

Al término de los tratamientos las alícuotas se lavaron para retirar el fármaco aplicado, con 1 ml de HSM-H mediante centrifugación durante 3 minutos a 3500 rpm; se retiró el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le añadió 200 μ l de SWM, se resuspendió y se tomaron 10 μ l, los cuales fueron colocados en una cámara de 20 μ m de profundidad (Microcell; Conception Technologies, San Diego, CA, USA) para su posterior análisis en el sistema computarizado *Hamilton Thorne Motility Analyzer* (HTM-IVOS v.12). Veinte cuadros fueron adquiridos a 60 Hz en campo oscuro, capturados con el objetivo de 20x a una temperatura constante de 37°C. De cada tratamiento entre 2000-3000 células fueron cuantificadas. La evaluación se realizó en 60 min aproximadamente.

4.-Procedimiento para elevar el AMPc intracelular.

Para elevar el AMPc intracelular se utilizaron dos inhibidores inespecíficos de fosfodiesterasas: pentoxifilina (Sigma-Aldrich, Inc.) y papaverina (Sigma-Aldrich, Inc.) (Fig.6), de acuerdo con los protocolos presentados en los cuadros anteriores. Se realizó una breve incubación de 5 min en diferentes concentraciones (0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM) de ambos fármacos a 37°C con alrededor de 10 millones de células en 200 μ l de medio HSM-H. La concentración y el tiempo de exposición fueron determinados con base en una estimación directa visual reportados por Neri (2007). Para el caso de la papaverina, esta incubación resulta en un aumento de alrededor de 9 veces en el contenido de AMPc y un aumento también de 9 veces en la actividad de la PKA (*Flores-Torres y cols, 2008*).

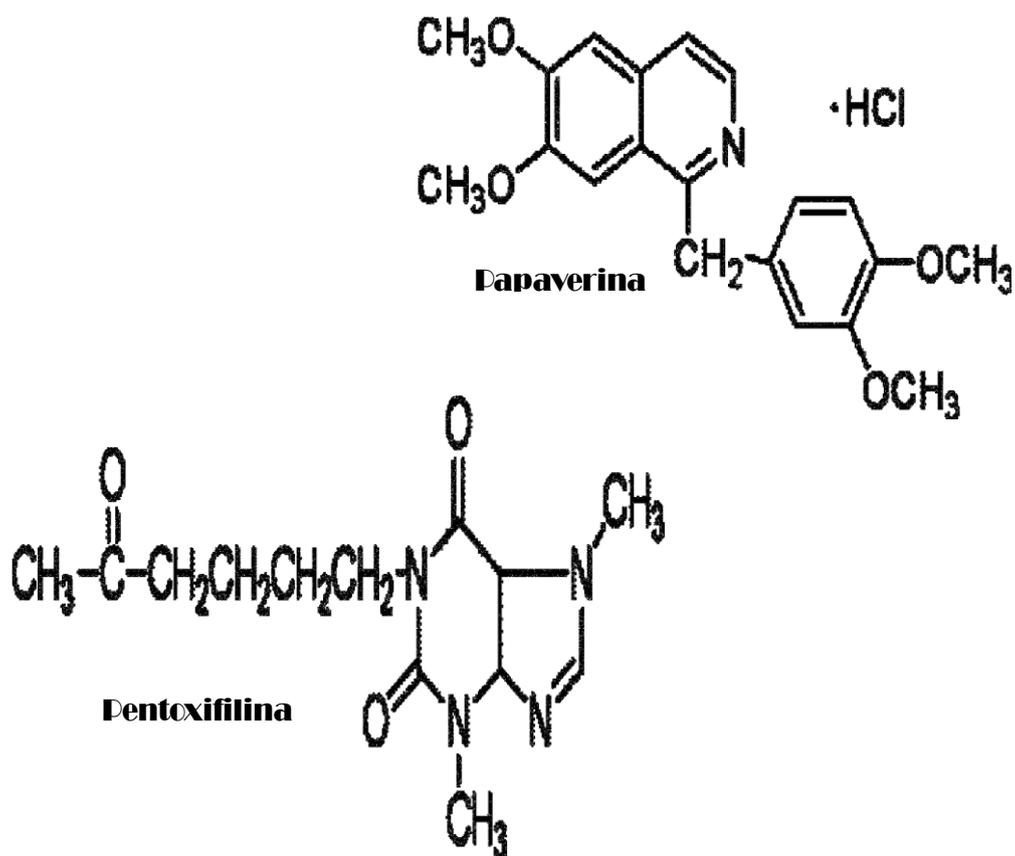


Fig.6. Inhibidores de PDE

5.-Análisis estadístico.

Los valores obtenidos se expresaron de una $n=6$, para la cuantificación de la movilidad espermática y una $n=8$, para los registros de fluorescencia en relación al promedio \pm error estándar (ES). Dada la variabilidad observada en los controles, los datos obtenidos se estandarizaron de manera que el control = 1 (100%). Se aplicó la Prueba de Duncan con un nivel de significancia de 0.01 para todos los casos.

VI. RESULTADOS

1.-Parámetros cinemáticos del sistema CASA del espermatozoide en el reposo.

Los parámetros aportados por el sistema CASA se pueden agrupar en: Porcentaje de espermatozoides móviles; Velocidades (VCL, VSL y VAP); Índices (STR y LIN), Frecuencia de flagelar (BCF) y Amplitud lateral de la cabeza (ALH); siendo los de mayor relevancia clínica los parámetros VCL, LIN y ALH ya que se han reportado como los parámetros indicadores de hiperactivación (*Mortimer, 2000; Kay and Robertson, 1998; Mortimer, 1997*) y por ende indican la capacidad fecundante de un espermatozoide, de tal forma que mientras mayor sea la VCL menor tendrá que ser su LIN, lo que nos indica que presentará una mayor ALH (parámetro de gran importancia ya que refleja el vigor del batido flagelar).

La tabla III muestra los parámetros cinemáticos obtenidos por el sistema CASA en condiciones normales de 6 donadores sanos, es decir, sin la aplicación de ningún inhibidor de fosfodiesterasas; a su vez también se muestran los valores considerados normales por la OMS utilizando como autoanalizador el Hamilton Thorn, a 37°C (*OMS, 2001*). Con base en los resultados obtenidos, se puede ver que los espermatozoides presentaron una movilidad activada dentro de los valores clínicos establecidos.

Parámetros cinemáticos	Muestra control	Limites Clínicos
% de movilidad	83,5 ±2,6	>50
VCL (μm/s)	116.9 ±6.6	>80
VSL (μm/s)	66.1 ±3,9	>30
VAP (μm/s)	75.5 ±4.4	>35
STR (%)	85.1 ±1,1	>80
LIN (%)	55.6 ±1,8	>50
ALH (μm/s)	4,6 ±0,2	<7
BCF (Hz)	30.5 ±1.2 (Hz)	

Tabla III. Parámetros cinemáticos obtenidos por el sistema CASA en condiciones normales. n=6 individuos ± error estándar (ES).

2.-Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides humanos analizados en CASA. Curvas dosis respuesta en CASA.

La Figura 7 muestra el cambio fraccional del porcentaje de espermatozoides móviles expuestos durante 5 minutos a diferentes concentraciones de inhibidor de fosfodiesterasa y posteriormente lavados por centrifugación en medio HSM-H. Cabe recordar que decidimos exponer los espermatozoides a estos inhibidores durante sólo 5 min, ya que estudios previos establecieron, para el caso de la papaverina, efectos notablemente altos en la estimulación de la movilidad y en la producción de AMPc (Neri, 2007). A 0.25 mM el porcentaje de espermatozoides móviles tuvo un ligero incremento mientras que a 2 mM, la papaverina produjo una disminución en la proporción de espermatozoides móviles, siendo significativa

en relación con la pentoxifilina a la misma concentración. Sin embargo, la pentoxifilina no produjo ningún efecto significativo sobre el porcentaje de espermatozoides móviles con respecto al control.

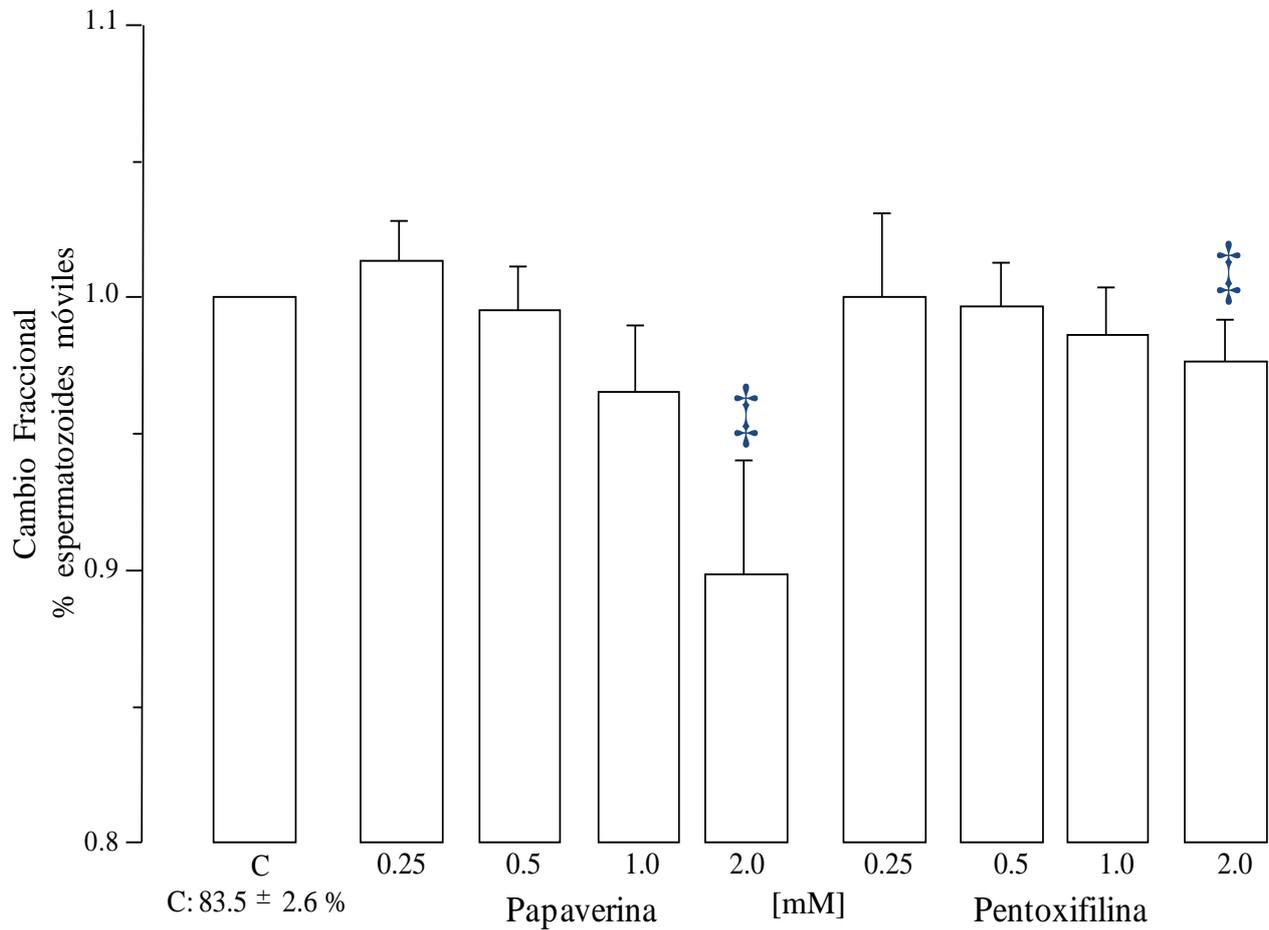


Fig.7. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en el porcentaje de espermatozoides móviles. Cada barra representa el promedio \pm ES de 6 experimentos ($n=6$). ‡ $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

Por otra parte, las velocidades, dadas en $\mu\text{m/s}$ por el sistema CASA, se modificaron ligeramente como se muestra en la Figura 8. La velocidad curvilínea (VCL) aumentó en presencia de ambos inhibidores. Con papaverina los efectos estimulantes se observaron a 0.25 mM y 1 mM, mostrando una diferencia significativa con respecto al control, sin embargo se detectó una ligera tendencia a revertir la velocidad al incrementar la dosis, aunque no por debajo del control; en cambio la pentoxifilina incrementó la velocidad conforme se aumentó la dosis, mostrando una diferencia significativa en la concentración más alta (2 mM) en relación con el control y con la papaverina en 2 mM. El incremento máximo fue de 116.9 ± 6.6 a 137 ± 5.8 con 0.25 mM papaverina y a 142.5 ± 6.2 con 2 mM de pentoxifilina. Tanto la velocidad de la trayectoria media (VAP) como la velocidad rectilínea (VSL) mostraron un efecto similar a la VCL, es decir, un mayor efecto a bajas dosis de papaverina con tendencia a disminuir el efecto a altas concentraciones en tanto que la pentoxifilina incrementó la velocidad en función de la concentración siempre en sentido positivo (Fig.8). Estos parámetros nos estarían diciendo que se está estimulando tanto la movilidad tipo A (movimiento líneal) como la B (movimiento curvilíneo), en base a los parámetros de la OMS, dados para una evaluación subjetiva.

Para la VAP el mayor incremento fue de 92.7 ± 4.1 con la aplicación de 2 mM pentoxifilina, en tanto que con papaverina fue de 85.2 ± 4 , aunque en una concentración casi 10 veces menor (0.25 mM), con respecto al control (75.5 ± 4.4), observándose diferencias significativas en 0.25 y 0.5 mM para papaverina y 0.5, 1 y 2 mM para pentoxifilina en relación al control. Entre los tratamientos sólo hubo diferencias significativas a altas concentraciones.

La VSL de los espermatozoides incubados con 2 mM de pentoxifilina mostró un incremento más marcado (81.8 ± 3.1) en relación al control (66.1 ± 3.9), y a la exposición a 0.25 mM de papaverina (72.6 ± 3.7). Sin embargo sólo se observó diferencia significativa con la pentoxifilina (0.5, 1 y 2 mM) con respecto al control. A 1 y 2 mM se encontró una diferencia significativa entre ambos fármacos.

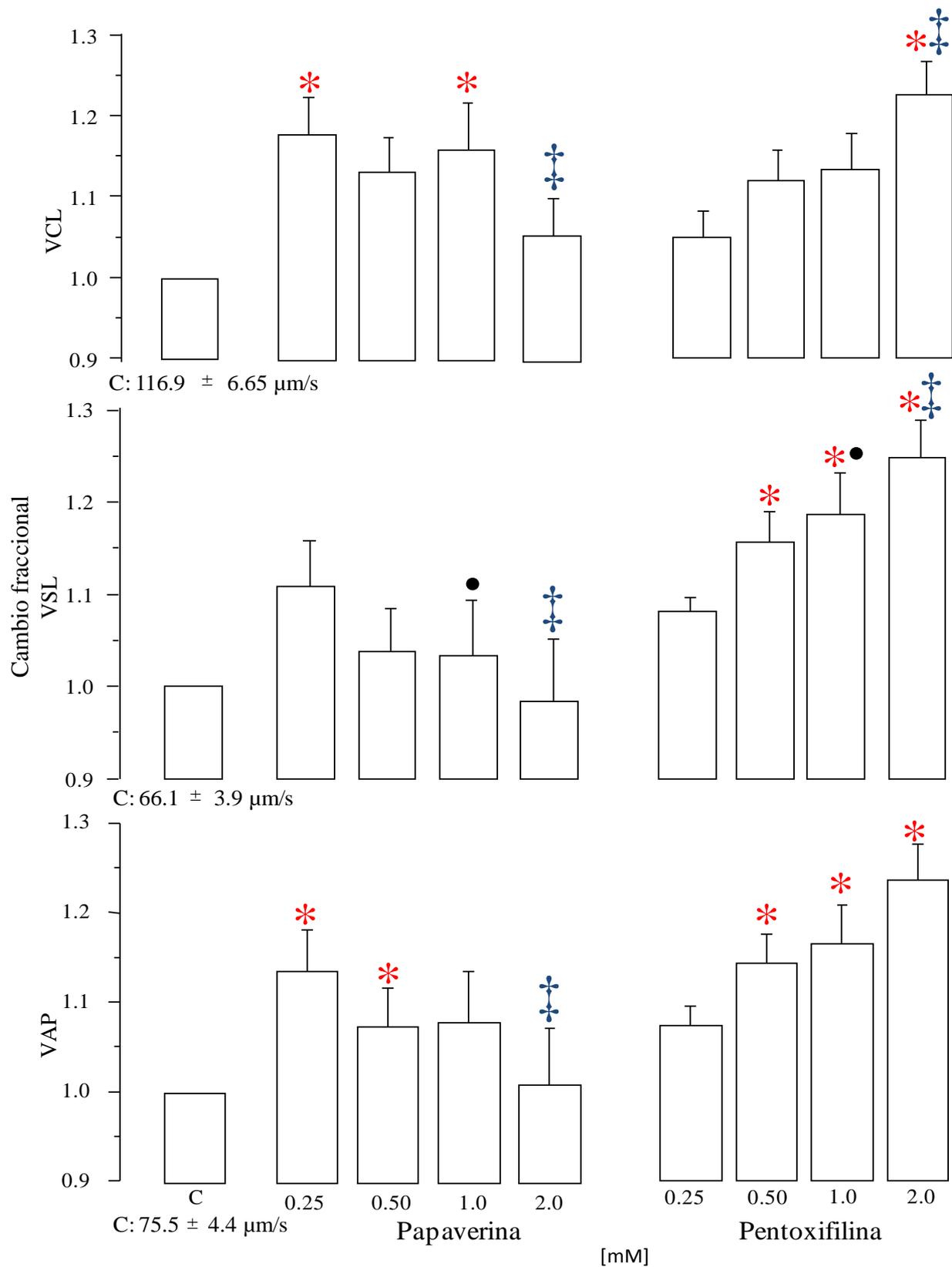


Fig.8. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los parámetros de velocidad espermática. VCL (Velocidad Curvilínea). VSL (Velocidad rectilínea). VAP (Velocidad de la trayectoria media). Cada barra representa el promedio \pm ES de 6 experimentos ($n=6$). * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos. •, † $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

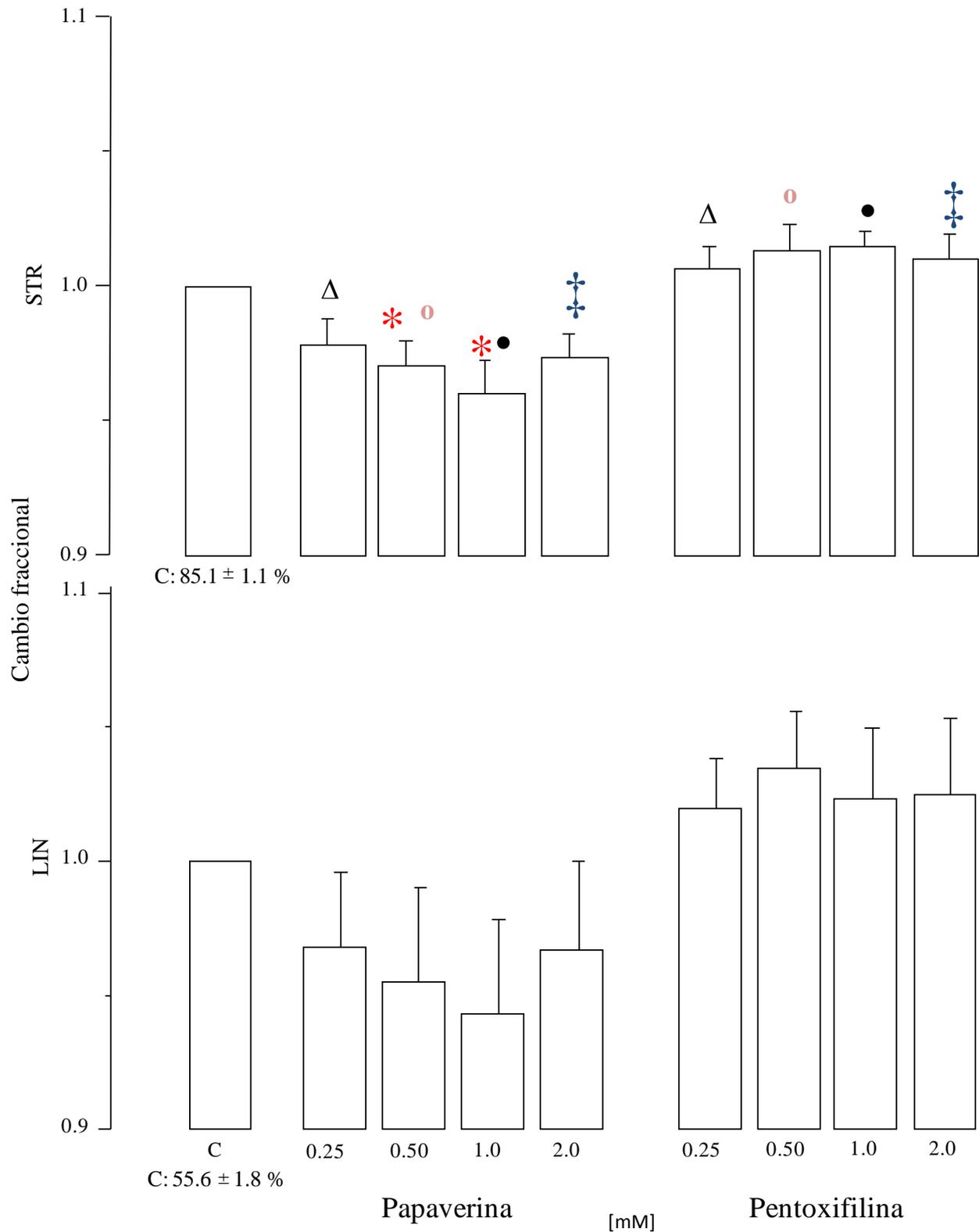


Fig.9. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en los Índices de movilidad espermática. Linealidad (LIN). Rectitud (STR). Cada barra representa el promedio \pm ES de 6 experimentos ($n=6$). * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos. Δ , \circ , \bullet , \ddagger $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

La rectitud (SRT) disminuyó con papaverina, e incrementó con pentoxifilina. Este resultado fue peculiar en el sentido de que, a diferencia de los parámetros antes señalados en los que los efectos presentan tendencias similares a bajas concentraciones, en este caso los inhibidores tuvieron efectos opuestos. Sólo se obtuvo diferencia significativa entre el control y la papaverina en las concentraciones intermedias (0.5 y 1 mM). El efecto opuesto entre ambos fármacos fue significativo para todas las concentraciones aplicadas (Fig.9). En cuanto a la linealidad, encontramos poco efecto con papaverina y un ligero incremento con pentoxifilina conforme se incrementó la dosis, sin embargo estos resultados no mostraron una diferencia significativa.

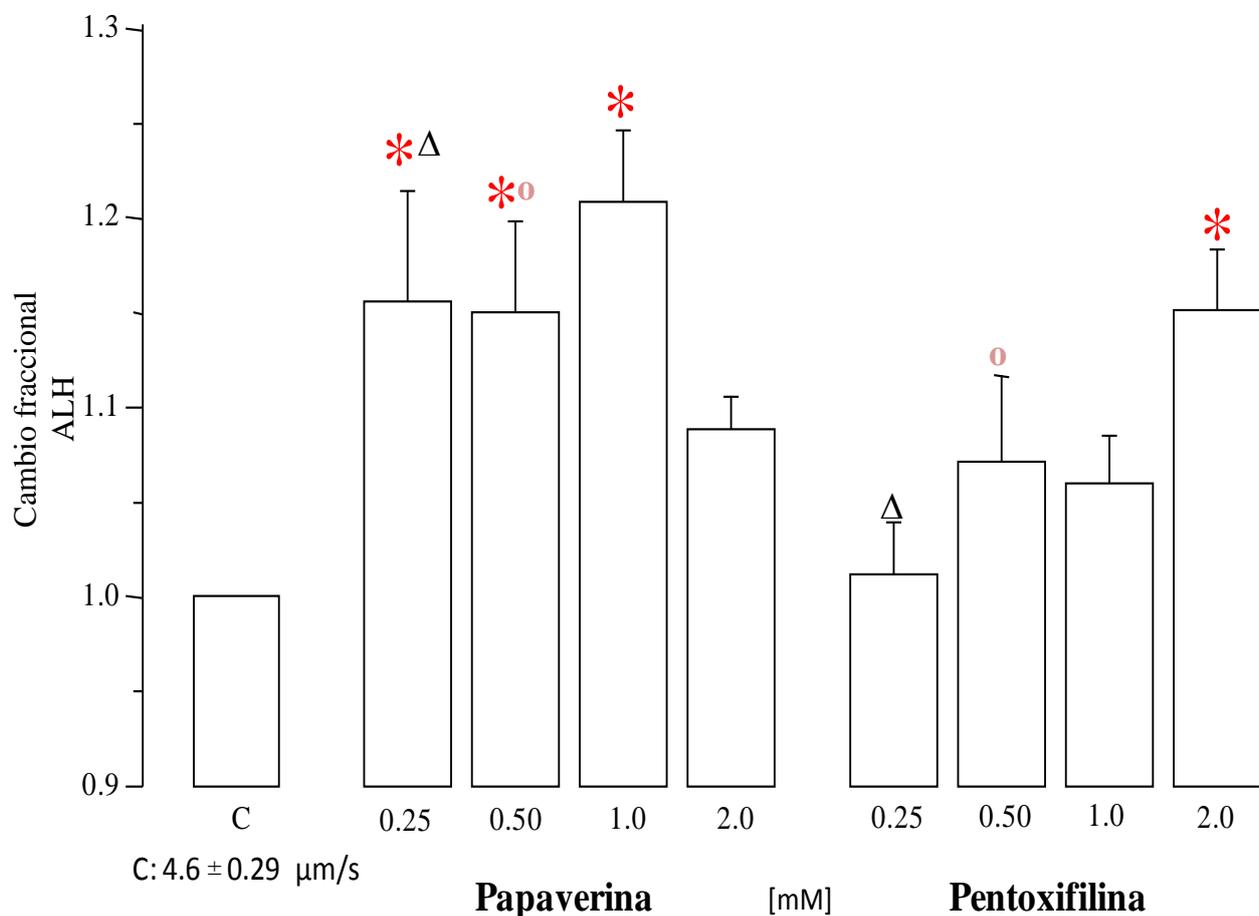


Fig.10. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en la amplitud lateral de la cabeza (ALH). Cada barra representa el promedio \pm ES de 6 experimentos ($n=6$). * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos. Δ , \circ $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

Por otra parte, la papaverina incrementó la ALH en función de la dosis, sin embargo, en la concentración más alta usada (2 mM) se tuvo un descenso aunque no menor al del control, observándose diferencias significativas sólo en las tres primeras concentraciones con respecto al control; en cambio la pentoxifilina sólo aumentó la ALH en la más alta concentración (2 mM) obteniéndose una diferencia significativa en relación con lo obtenido en el control (5.2 ± 0.27 vs 4.6 ± 0.29 $\mu\text{m/s}$, respectivamente) y el incremento fue mucho menor en comparación con 1.0 mM de papaverina (5.2 ± 0.27 vs 5.5 ± 0.2 $\mu\text{m/s}$, respectivamente) (Fig.10). Hubo diferencias significativas entre la aplicación de 0.25 y 0.5 mM entre ambos fármacos.

El efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en la frecuencia del batido flagelar (BCF) se muestra en la figura 11, y se puede observar que tanto papaverina como pentoxifilina incrementaron la BCF con respecto al control. La pentoxifilina mostro un mayor incremento en la BCF en función de la dosis, mostrando diferencia significativa con respecto al control (34 ± 0.9 vs 30.5 ± 1.2 Hz/s), en tanto que, la papaverina tuvo un mayor efecto en la menor concentración valor que prácticamente se mantuvo en concentraciones más altas, quizás con una ligera tendencia a la baja.

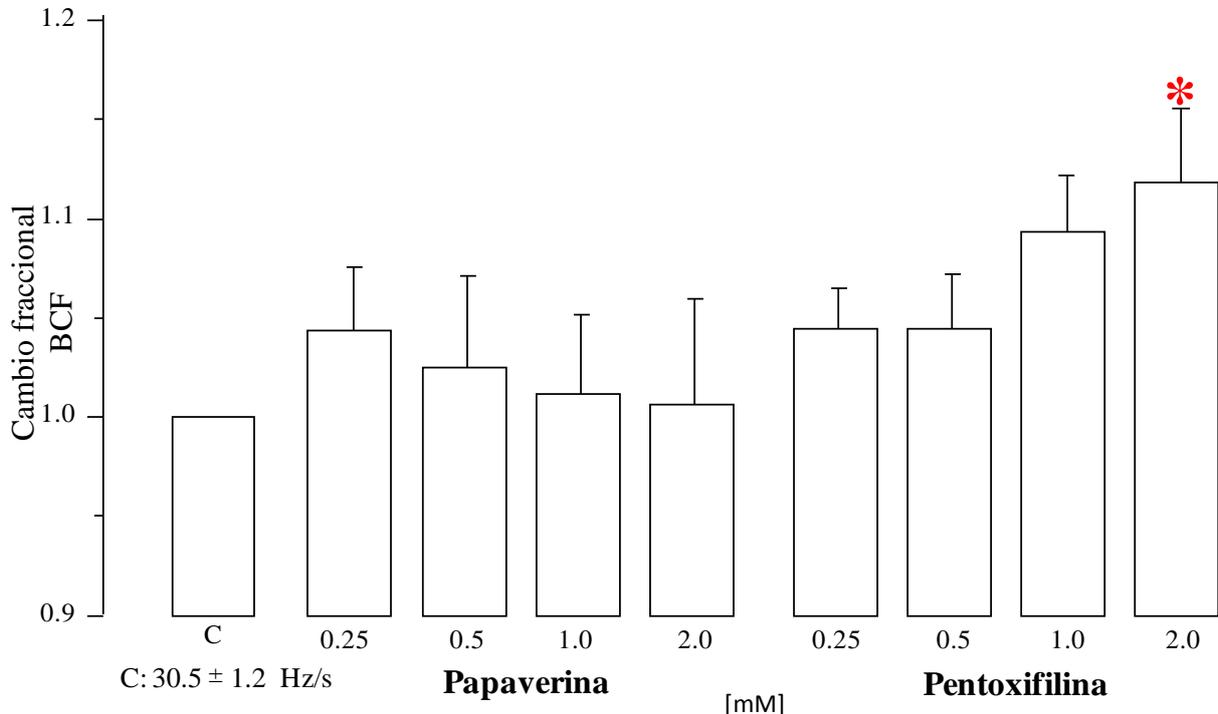


Fig.11. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en la frecuencia del batido flagelar (BCF). Cada barra representa el promedio \pm ES de 6 experimentos ($n=6$). * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos.

3.-Efecto de la papaverina y la pentoxifilina en el aumento de Ca^{2+} inducido por la progesterona. Curva dosis-respuesta.

Obtenidos los efectos de ambos inhibidores sobre la movilidad espermática decidimos comparar ahora su efecto en el influjo de calcio inducido por la progesterona. A este respecto, es necesario recordar que como antecedentes teníamos que a diferencia de la papaverina (Neri, 2007), según Aitken y cols (1998) la pentoxifilina no estimulaba la entrada de calcio inducida por la progesterona (ver fig. 3 en Justificación). Esta diferencia podría a su vez correlacionar con las diferencias observadas en la movilidad. Con esto en mente, estudiamos el efecto de diferentes dosis de pentoxifilina y papaverina, incubadas exactamente como incubamos para los experimentos de movilidad espermática, sobre la entrada de calcio inducida por la progesterona.

Como se muestra en la figura 12, la adición de 4 μM de progesterona produjo un aumento en el calcio intracelular transitorio, alcanzando un pico de casi 2 μM en unos pocos segundos. Después del pico, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recobró valores cercanos a la basal en alrededor de un minuto. La incubación con diferentes concentraciones de papaverina produjo un aumento dependiente de la dosis con una ligera tendencia a saturar o aún revertir la estimulación a 2 mM del inhibidor, mostrando en todas las concentraciones (0.25, 0.5, 1 y 2 mM) aplicadas diferencia significativa en relación al control (fig. 13). De manera inesperada, la pentoxifilina produjo también estimulación de la entrada de calcio dependiente de la dosis, aunque en menor magnitud comparada con la papaverina a bajas dosis. Se observaron diferencias significativas en 1 y 2 mM con respecto al control. Así mismo, la comparación de ambos fármacos también mostró diferencias significativas en 0.25, 0.5 y 1 mM de papaverina contra pentoxifilina, respectivamente. Contrario a lo obtenido por Aitken y cols, quienes no observaron dicho influjo.

Otro efecto que nos llamó la atención fue el hecho de que la pentoxifilina no afectó los valores de $[\text{Ca}^{2+}]$ basal, fenómeno que sí se presenta con la preincubación con papaverina (Neri, 2007). La línea horizontal punteada trazada en la figura 12, muestra que, en efecto, mientras la pentoxifilina no afectó los valores de $[\text{Ca}^{2+}]$ basal en el rango de dosis probado. La figura 14 muestra que la papaverina aumentó estos valores de una manera dependiente de la dosis de 0.39 ± 0.03 a 0.78 ± 0.14 con 2 mM de papaverina, dando diferencias significativas

desde la concentración 0.5 mM con relación al control. Al comparar ambos tratamientos, también mostraron diferencias significativas en valores iguales o mayores de 0.5 mM.

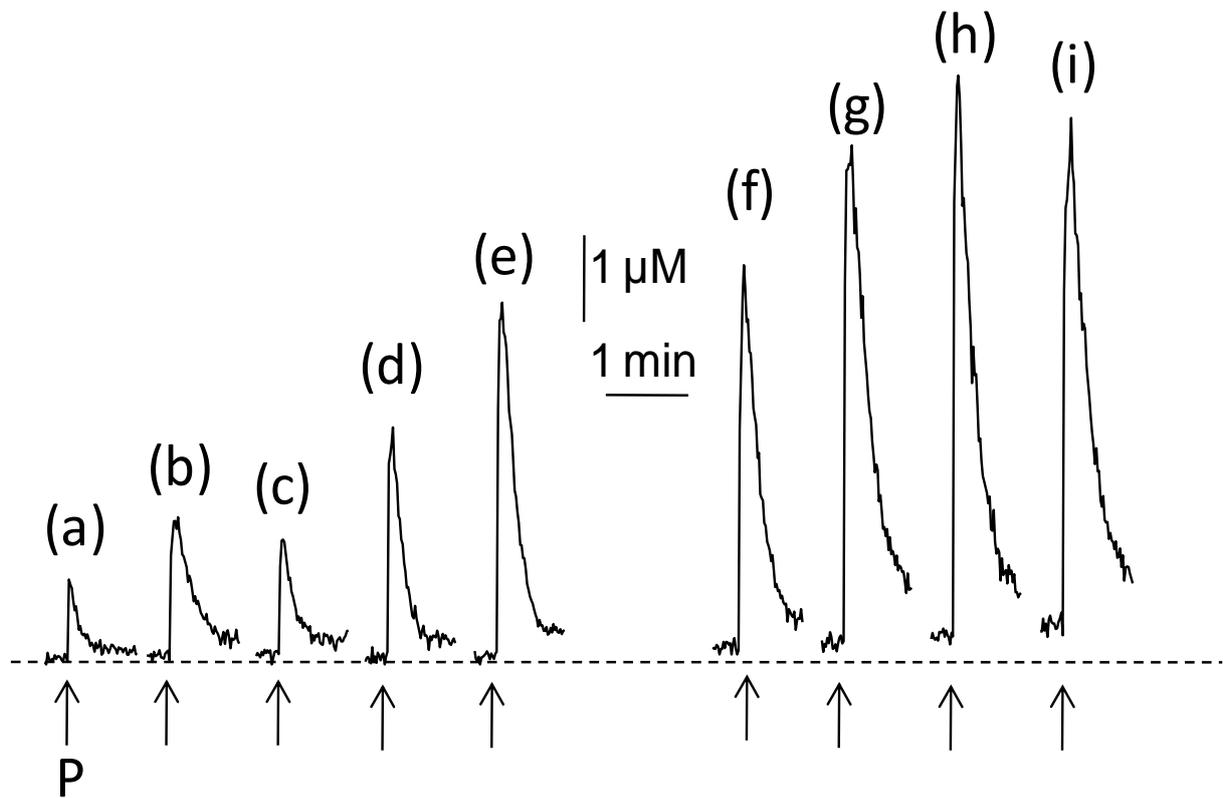


Fig.12. Efecto de la progesterona (P) en espermatozoides humanos tratados con inhibidores de fosfodiesterasas en la $[Ca^{2+}]_i$. Trazo representativo de una $n=8$. a) Control. b-e) espermatozoides incubados con Pentoxifilina 0.25, 0.5, 1 y 2 mM respectivamente. f-i) espermatozoides incubados con Papaverina 0.25, 0.5, 1 y 2 mM respectivamente. La flecha indica la adición de 4 mM de P. La línea horizontal punteada es el valor de calcio intracelular en el reposo en el control (células no tratadas).

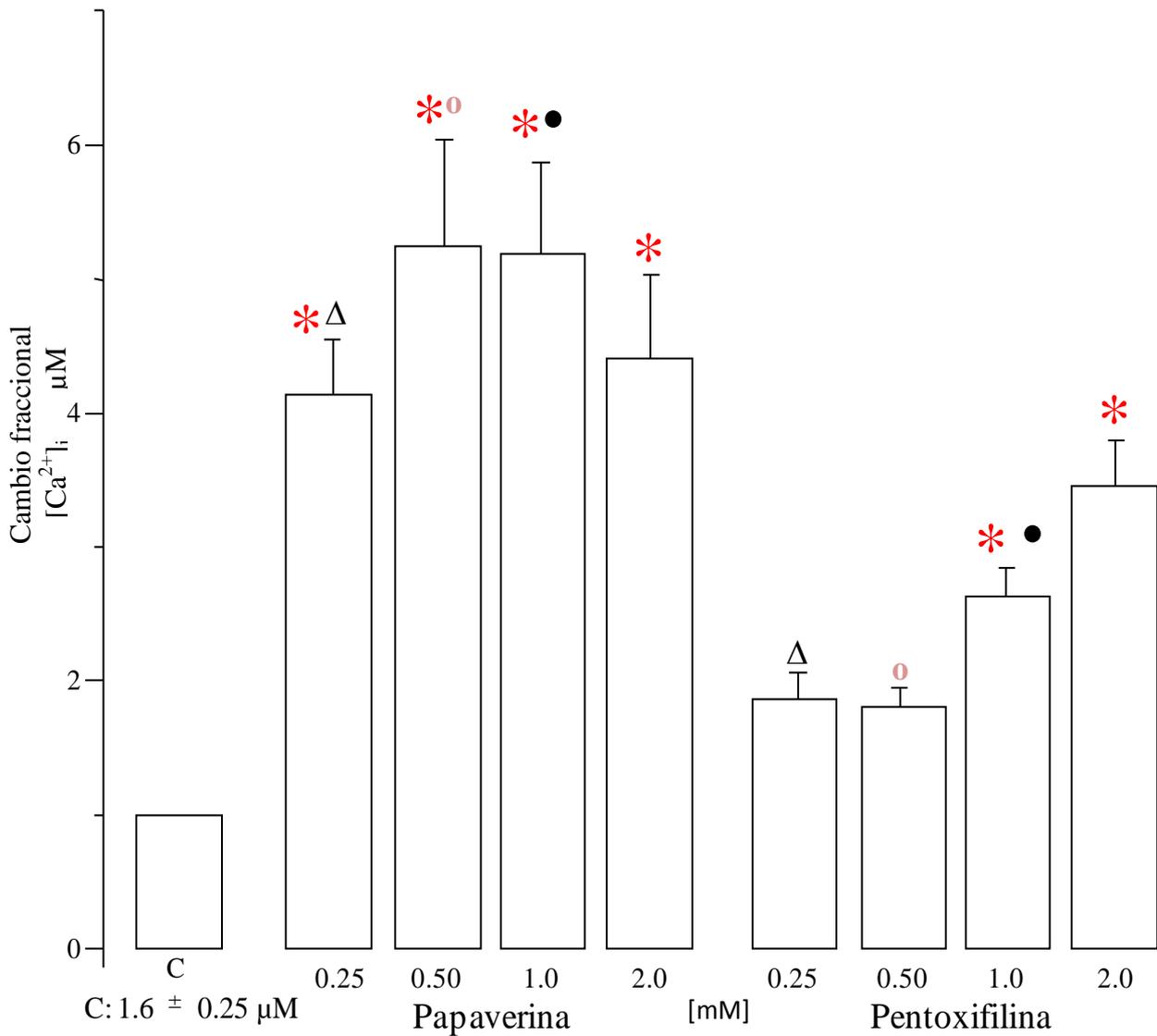


Fig.13. Influxo de calcio inducido por la progesterona en función de la concentración indicada de pentoxifilina o papaverina. El influxo se define como el valor al pico de calcio menos el valor de calcio basal, tomados de trazos como los descritos en la figura 12. Promedio \pm ES de $n=8$ individuos. * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos. Δ , ○, ● $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

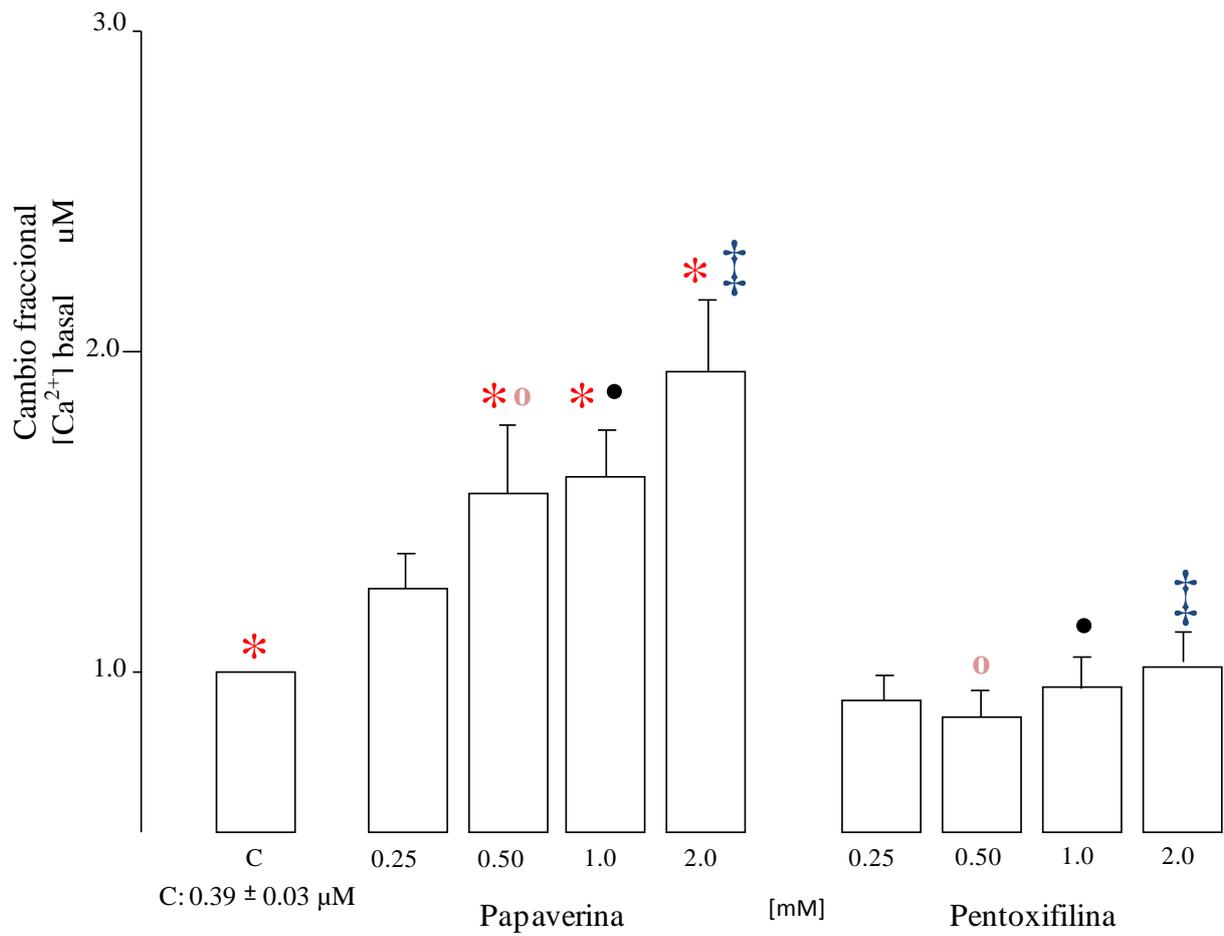


Fig.14. Valores de $[Ca^{2+}]_i$ basal obtenidos después de preincubar 5 minutos con las cantidades indicadas de pentoxifilina y papaverina. Promedio \pm ES de $n=8$ individuos. * $p<0.01$ entre el control y los tratamientos. O, ●, ‡ $p<0.01$ entre tratamientos con fosfodiesterasa a la misma concentración.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue comparar el efecto de dos inhibidores de fosfodiesterasas (papaverina y pentoxifilina) en los parámetros de la movilidad espermática en espermatozoides humanos no capacitados. En este contexto, también se propuso ver si existía una relación entre los parámetros de la movilidad y las respuestas de los espermatozoides, expuestos a estos inhibidores, a la entrada de calcio inducida por la progesterona.

En términos generales, se observaron efectos concomitantes tanto la papaverina como la pentoxifilina estimularon la velocidad de movimiento (tipo A y tipo B), así como la frecuencia de batido flagelar, aunque las respuestas a papaverina fueron más potentes a bajas concentraciones y con tendencia a disminuir en concentraciones altas, mientras que la pentoxifilina presentó un efecto progresivo con la dosis. Estos efectos sugieren que la papaverina, a diferencia de la pentoxifilina, si bien tiene efectos más potentes en bajas concentraciones, pudiera generar efectos tóxicos en concentraciones altas que disminuyan su efectividad. En este sentido, en comparación se observó que la pentoxifilina tiene un efecto más pausado con la dosis y aparentemente no tóxico. Los parámetros CASA de rectitud y linealidad tuvieron efectos ligeramente contrapuestos, especialmente en lo que se refiere a rectitud. Una disminución en la rectitud causada por la papaverina podría interpretarse como un aumento en un parámetro de movilidad parecida a la hiperactiva de la población, como lo sugiere el hecho de que la papaverina aumenta la velocidad de amplitud lateral de la cabeza del espermatozoide. En contraste, la pentoxifilina presentó un ligero aumento en la rectitud con efectos pequeños en la linealidad y amplitud lateral de la cabeza. Estos efectos sugieren que mientras ambos inhibidores estimulan la movilidad, cualitativamente la papaverina tendería a inducir más movilidad hiperactivada en una pequeña fracción de la población de espermatozoides, lo que sugiere que esta pequeña fracción presentaría menos afinidad a las células del epitelio oviductual, permitiéndoles pasar el istmo y poder llegar a la zona de fecundación.

Los efectos de la papaverina y la pentoxifilina en la entrada de calcio inducida por la progesterona mostraron diferencias interesantes. El aumento en el calcio intracelular basal por parte de la papaverina no observado con la pentoxifilina, pudiera asociarse con los cambios

cualitativos en los parámetros CASA. Se ha visto que para hiperactivarse, el espermatozoide requeriría aumentar el calcio intracelular (*Darszon y cols, 2006*) y más específicamente el intraflagelar, a través de un influjo de calcio por la vía de los canales de calcio: CatSper localizados en el flagelo (*Qi y cols, 2007*) A este respecto, la pequeña diferencia entre la papaverina y la pentoxifilina en los parámetros CASA relativos a la disminución en la linealidad y el aumento en la torsión de la cabeza del espermatozoide aumentados con papaverina, podrían estar relacionados con aumento en el calcio intracelular producido por este inhibidor.

Otro resultado que resultó inesperado fue que el influjo de calcio inducido por la progesterona se estimuló por preincubación con pentoxifilina. Como antecedente se tenía que la pentoxifilina, en una concentración 3 mM y en presencia de 5 mM del análogo de dibutiril-AMPC, por 3 horas, no afectaba la entrada de calcio inducida por la progesterona (*Aitken y cols, 1998*). Aún cuando no usamos el análogo, observamos que una incubación por 5 min y a bajas concentraciones a la utilizada por Aitken y cols se produce un influjo de calcio. La ausencia de efecto de la pentoxifilina observado por Aitken y cols pudiera atribuirse al hecho de que esos experimentos se hicieron en células inmovilizadas en cubreobjetos, en estudios de microfluorescencia. Es posible que aquellos eventos que dispara el inhibidor de la PDE, aumento en el AMPc y estimulación de la cinasa A (PKA), pudieran revertirse durante el procedimiento de pegado de las células al cubreobjetos; por otra parte, una sobre exposición a AMPc intracelular con la inclusión de el análogo dibutiril-AMPC pudo, en su caso, tener efectos tóxicos que se reflejaran en la ausencia de estimulación sobre la acción de la progesterona.

De los resultados de este trabajo se desprende que los inhibidores de las fosfodiesterasas producen un aumento en la entrada de calcio inducida por la progesterona, siendo la papaverina, en estas condiciones experimentales más potente que la pentoxifilina, mientras que en la movilidad, ambos fármacos estimularon, aunque es importante recordar que en los parámetros de hiperactivación la papaverina resultó más potente en este efecto que la pentoxifilina. Es posible que en ambos casos el AMPc por sí mismo o la activación de la PKA expliquen ambos fenómenos. Como se menciona en el párrafo anterior, pudiera haber una relación entre el aumento en el calcio intracelular basal y la generación de una población proclive a la hiperactivación en la población tratada con papaverina.

Como ya se abordó la movilidad es un requisito fundamental para que se lleve a cabo la fecundación, de tal forma que una baja o nula movilidad resulta en infertilidad, por lo que es muy importante que el espermatozoide al ser depositados en el TGF logre activarse para poder así llegar al itsmo, en donde es hiperactivado y capacitado. La alteración de la movilidad espermática no sólo se ve en el porcentaje de espermatozoides móviles de una muestra seminal de un individuo en general, sino también muestra una mala calidad en la movilidad espermática reflejada principalmente en las velocidades, índices y ALH; además de que presentan incapacidad de desarrollar una movilidad hiperactivada o de ser capacitados (*Buffone y cols, 2005*). Un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la movilidad espermática nos permitiría tener un mayor control de dicha capacidad y poder aplicar fármacos que permitan no sólo estimular, sino también inhibir la movilidad de los espermatozoides, y poder tener acceso, más adelante, a algún anticonceptivo masculino eficaz y saludable.

VIII. CONCLUSIONES

- La papaverina produce estimulación, dependiente de la dosis, en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides humanos no capacitados en un pequeño rango de concentración (de hasta 1.0 mM), por encima del cual la estimulación se reduce.
- La papaverina y la pentoxifilina estimularon de manera parecida la velocidad curvilínea, la velocidad de trayectoria media y la velocidad rectilínea. La pentoxifilina muestra una tendencia progresiva con respecto a la dosis en tanto que la papaverina disminuye su estimulación a dosis relativamente altas.
- La papaverina y la pentoxifilina producen efectos pequeños pero opuestos en la rectitud del movimiento. La rectitud, la linealidad y la amplitud de movimiento lateral de la cabeza se estimularon con la papaverina.
- La preincubación con pentoxifilina produce estimulación del influjo de calcio inducido por la progesterona en los espermatozoides humanos, aunque en menor magnitud que la preincubación producida por la papaverina.
- A diferencia de la papaverina, la pentoxifilina no aumenta los niveles de calcio intracelular basal en los espermatozoides humanos.
- El efecto de la papaverina sobre el calcio intracelular basal podría correlacionarse con cambios que este inhibidor induce en la linealidad y en los desplazamientos laterales de la cabeza. Esta posibilidad debería explorarse.

ANEXO A

Espermatobioscopias											"límites Clínicos"
Donadores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Evaluación Macroscópica											
Días de Abstinencia	5	5	4	3	4	4	5	5	3	4	3-6 días
Color	blanco- grisáceo										
Olor	a cloro										
licuefacción	25	20	15	20	20	25	15	20	20	20	Antes de 30 min
Acidez iónica	7,8	8	8	7,5	8	8	8	8	7	7,5	7 - 8 pH
Volumen	2,5	2	3,5	2	5	2,5	5,5	2,8	3,5	3	2-5 ml
Evaluación Microscópica											
Zoospermas/ml	58,7	94,8	72	76,6	58,2	65,3	26,8	78,3	21,6	21,6	> 20 millones
Zoospermas móviles/ml	43	51,3	54,3	65,3	49,6	53,8	21,9	66,1	13,3	13,8	> 10 millones
Vivos %	88	80	85	98	98	89	74	83	80	76	> 50 %
Movilidad (%)	73	54	75	85	85	82	82	84	61	64	> 50 %
Índices de Velocidad											
Velocidad promedio (VAP)	42	37,2	49,1	49,9	63,4	37,5	70,9	66,9	58,7	55,9	30.0-42.4 mic/seg
Velocidad progresiva (VSL)	32,1	25,6	36,3	37,6	47,4	28	56,9	48,1	46,2	46,6	26.0-34.8 mic/seg
Velocidad rectilínea (STR)	75	71	72	75	74	74	79	71	76	81	71-89 %
Amplitud Lateral de la cabeza (ALH)	3,5	3,9	5,3	4,6	6	3,5	5,2	6,3	5,3	4,5	> 3.3 mic
Morfología											
Normales (%)	18	16	17	16	18	17	14	16	15	15	>14 %

Anexo A. Espermatobioscopias de los 10 donadores utilizados para la aplicación de los inhibidores de fosfodiesterasas, como puede verse todos los donadores entran dentro de los parámetros clínicos de donadores sanos considerados por la OMS (OMS, 2001).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ain R, Devi KU, Shivaji S y Seshagiri PB. Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signaling molecules. *Mol. Hum. Reprod.* 1999. Vol. 5. No. 7. Pp: 618-626.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, y Irvine S. On the cellular mechanisms by which the bicarbonate ion mediates the extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 186-196.
- Álvarez L. C. Tesis Doctoral. 2003. Análisis Integrado de Morfología y movilidad espermática humana con el uso del *Sperm Class Analyzer*. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia. 170 pp.
- Bajpai M y Doncel G. Involment of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction.* 2003. 126:183-195.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C y Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation y lipid remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1. 1996. Pp: 189-205.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M y Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity y acrosome reaction. *Front. In Biosc* 5. 2000. Pp: 110-123.
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular y Cellular Endocrinology.* 2002. 187: 139-144.
- Buffone MG, Calamera JC, Vestraeten SV, Doncel GF. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation y membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction.* 2005. 129. 697-705.

- Calogero A, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrillo N, Thornton S y D'Agata R. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*. 1998. 13 (4): 911–915
- Carlson E, Westenbroek E, Quill T, Dejian R, Clapham E, Hille B, Garbers L y Babcock F. *Catsper1* required for evoked Ca²⁺ entry y control of flagellar function in sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. 100: 14864-14868.
- Cooper TG. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*. 2007. Pp: 533-539.
- Curtis H y Barnes NS. 2001. *Biología. Medica Panamericana*. 6° ed. Pp.: 1314-1339.
- Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, Nishigaki T, Treviño C, Wood C y Beltran C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduc. Review*. 2006. 131:977-988.
- De Jonge C. y Barratt C. L. R. 2006. *The sperm cell. Reproduction. Maturation. Fertilization. Regeneration*. Cambridge. University Press. 372 pp.
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 2005. 11(3):205-214.
- Eckert R. 1990. *Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones*. Interamericana McGraw-Hill. 3ª ed. Pp.: 368-386.
- Eisenbach M. y Giojalas L.C. Sperm guidance in mammals: an unpaved road to the egg. *Nature*. 2006. Pp: 276-285.
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA. Mice deficient for soluble Adenylyl

cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. 101: 2993-2998.

- Gartner PL y Hiatt LJ. 2002. Texto Atlas de Histología. McGraw-Hill. 2^a ed. Pp.: 463-483.
- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA y Guzman-Grenfell AM. Stimulation of voltaje-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. Archives in Biochemistry y Biophysics. 2002. 408: 205-210.
- Grynkiewicz G, Poenie M y Tiesen Y. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. J. Biol. Chem. 1985. 260: 3440-3450.
- Harper CV y Publicover SJ. Reassessing the role of progesterone in fertilization-compartmentalized calcium signaling in human spermatozoa?. Hum Reprod. 2005; Vol. 20 No. 10 pp. 776-786.
- Hickman CP Jr., Roberts LS y Parson A. 2000. Principios integrales de Zoología. McGraw-Hill. Interamericana. 10^o ed. Pp:80-102.
- Hoskins DD. y Vijayaraghavan S. A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En Gagnon C, PH. D. (ed). Controls of Sperm Motility Biological y Clinical Aspects. CRC Press. 1990: 53-62 pp.
- Hoskins DD, Hall ML y Munsterman D. Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. Biol Reprod. 1975. Sep 13 (2): 168-176.
- Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. J Reprod Fert Suppl. 1998. 53: 73-84.
- Kay VJ, Coutts JR, Robertson L. Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. Hum Reprod. 1993; 8:727-731.

- Kay VJ. y Robertson L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Hum Reprod. Update* 1998, Vol. 4, No. 6 pp. 776-786.
- Mortimer ST. CASA- Practical Aspects. *J Yrol.* 2000. 515-524.
- Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 1997, Vol. 3, No. 5 pp. 403–439.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivation motility. *Fertil Steril.* 1999;71:919–923.
- Neri-Vidaurre PV, Torres-Flores V, González-Martínez MT. A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343: 105-109.
- Neri V. PC. Tesis de Maestría. 2007. Sensibilidad de los canales de calcio dependientes del voltaje al pHi en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. UNAM. 58 pp.
- Oko R y Clermont Y. Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail. En Gagnon C, PH. D. (ed). *Controls of Sperm Motility Biological y Clinical Aspects.* CRC Press. 1990: 3-28.
- OMS. 2001. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Edit. Médica Panamericana. 4^{ta} ed. España. 152 pp.

- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE y Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by Catsper2 is required for fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100:14869–14874.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA y Clapham DE. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *PNAS.* 2007. 104:4. 1219-1223.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL y Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001. 413. 603-609.
- Ruiz DF. 1988. *Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción.* UNAM. Pp: 25-43.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Barbour J, Zimmer RK, Neuhaus EM y Hatt H. Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol Chem.* 2004. 279(38). 40194-40203.
- Suarez SS y Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update.* 2006. 12 (1). 23-37.
- Suarez SS. Hyperactivated Motility in Sperm. *J Androl.* 1996. 17 (4). 331-335.
- Sullivan R, Frenette G y Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 2007. 9: 483-491.
- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development.* 2006. 18.25-38.
- Visconti P y G Kopf. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998. 59: 1-6.