



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

¿Existe una hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación en espermatozoides de humano?

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
PAULINA TORRES RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ  
Instituto de Biotecnología- UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY  
Instituto de Biotecnología- UNAM  
DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY  
Instituto de Biotecnología- UNAM

México, D.F. Junio, 2013



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.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Consorcio de la Fisiología del  
Espermatozoide

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

1. Datos del alumno

Paulina  
Torres  
Rodríguez  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Posgrado en Ciencias Bioquímicas  
Instituto de Biotecnología  
511022414

2. Datos del tutor

Dra.  
Claudia Lydia  
Treviño  
Santa Cruz

3. Datos del sinodal 1 (Presidente)

Dr.  
Martín Gustavo  
Pedraza  
Alva

4. Datos del sinodal 2 (Secretario)

Dr.  
Mario Ernesto  
Cruz  
Muñoz

5. Datos del sinodal 3 (Vocal)

Dra.  
Mayel  
Chirinos  
Espín

6. Datos del sinodal 4 (Vocal)

Dra.  
Helena  
Porta  
Ducoing

7. Datos del sinodal 5 (Vocal)

Dr.  
Juan José  
Acevedo  
Fernández

8. Datos del Comité Tutor

Dra.  
Yvonne Jane  
Rosenstein  
Azoulay

9. Datos del Comité Tutor

Dr.  
Roberto Carlos  
Muñoz  
Garay

10. Datos del trabajo escrito

¿Existe una hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación en espermatozoides de humano?

57 p.

2013

*A mi familia*

*Por conseguir un sueño a base de esfuerzo*

## **Agradecimientos:**

Esta tesis no es fruto del trabajo individual, sino de un esfuerzo común de mucha gente. Por ello quisiera expresar mi agradecimiento a las siguientes personas, sin cuyo estímulo y ayuda no hubiera sido posible este proyecto.

A la Dra. Claudia Treviño, al Dr. Alberto Darszon y al Dr. Takuya Nishigaki por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis de maestría en su laboratorio.

Un agradecimiento especial a la Dra. Claudia por haber puesto a mi disposición todo lo necesario para realizar este trabajo, por toda la entrega, dedicación en la gestación y desarrollo de este trabajo de tesis, por motivarme y transmitirme la inquietud y curiosidad que se requiere para llegar a ser un buen investigador y finalmente por su amistad.

A todos los integrantes del Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide, por la calidad humana y científica, pero sobre todo por demostrar que es posible trabajar en equipo con una estructura tan fuerte, donde cada opinión vale y aporta, por ser un modelo de grupo único y finalmente por acompañarme cada día de este período con alegría y compañerismo con el que da gusto hacer ciencia.

A la Dra. Rosenstein y el Dr. Muñoz Garay por el honor de tenerlos en mi comité tutorial, por su constante ayuda en la supervisión científica y crítica de este trabajo, y muy especialmente por hacerme partícipe de sus amplios conocimientos, de su experiencia, y de sus valiosas enseñanzas. Su ejemplo y apoyo han sido fundamentales, para mí, tanto profesional como personalmente.

A los miembros de mi comité evaluador: Dr. Martín Gustavo Pedraza, Dr. Mario Ernesto Cruz, Dra. Mayel Chirinos, Dra. Helena Porta y al Dr. Juan José Acevedo Fernández por sus valiosos comentarios y aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Jesús Santa-Olalla y nuevamente a la Dra. Rosenstein por abrirme sin reservas, las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Biol. Erika Melchy, Biol. Carlos Mojica por su gran ayuda técnica con los citómetros de flujo, sin la cual la realización de una parte importante de este trabajo no habría sido posible.

A mi familia y amigos, en particular a mi mamá, por ser tan pacientes conmigo durante todo este tiempo de trabajo intenso. Por estar siempre a mi lado compartiendo mis triunfos, por su inmenso cariño y por su constante apoyo.



### **Financiamiento:**

La realización de esta tesis fue financiada por proyectos de investigación, becas de mantenimiento, apoyo de tesis de las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) (99333 (CT) y 128566 (AD))
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico/ Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA /UNAM) (IN202212-3 (CT))
- Programa de Posgrado de Ciencias Bioquímicas, UNAM

# Índice:

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
LA FECUNDACIÓN.....	3
EL GAMETO MASCULINO HUMANO (ESPERMATOZOIDE).....	3
LA ACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD.....	5
LA CAPACITACIÓN .....	6
El potencial de la membrana plasmática cambia durante la capacitación.....	7
LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
OBJETIVO GENERAL .....	13
OBJETIVOS PARTICULARES .....	13
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>14</b>
REACTIVOS.....	14
EQUIPOS .....	16
A) OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE ESPERMATOZOIDES.....	16
B) CAPACITACIÓN .....	17
C) ESPECTROFLUOROMETRÍA CONVENCIONAL.....	17
D) CITOMETRÍA DE FLUJO .....	19
∅ Calibración del equipo.....	20
§ Control de calidad diario (CS&T).....	21
∅ Compensación .....	21
∅ Adquisición.....	22
§ Medición de Calcio y pH intracelular .....	22
§ Medición de potencial de membrana.....	22
∅ Análisis estadístico e interpretación de datos .....	24
∅ Separación de poblaciones .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
MEDICIÓN DE POTENCIAL DE MEMBRANA EN ESPECTRÓMETRO CONVENCIONAL.....	27
MEDIDAS DE CALCIO Y PH EN CITOMETRÍA DE FLUJO .....	30
MEDIDAS DE POTENCIAL DE MEMBRANA EN CITOMETRÍA DE FLUJO .....	33
SEPARACIÓN DE POBLACIONES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	41
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>49</b>
TABLA (ANEXOS) 1: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES BCECF Y DiSC <sub>3</sub> (5).....	49
TABLA (ANEXOS) 2: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES DiSBAC <sub>2</sub> (3) Y Di-8-ANEPPS.....	50
TABLA (ANEXOS) 3: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES FLUO3-AM Y YODURO DE PROPIDIO .....	51
TABLA (ANEXOS) 4: DESCRIPCIÓN DE INDICADORES FLUORESCENTES SENSIBLES A POTENCIAL DE MEMBRANA, CALCIO Y PH, CORRELACIONANDO CON SU PAREJA DE INDICADOR DE VIABILIDAD .....	52
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>53</b>

## **Índice de figuras:**

FIGURA 1: ESQUEMA DEL ESPERMATOZOIDE DEL HUMANO.	4
FIGURA 2: EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN EN LA CAPACITACIÓN.	10
FIGURA 3: MODELO DE REACCIÓN ACROSOMAL.	11
FIGURA 4: ESQUEMA DEL ESPECTROFLUORÓMETRO CONVENCIONAL.	17
FIGURA 5: ESQUEMA DEL CITÓMETRO DE FLUJO FACSCANTO II.	19
FIGURA 6: ESQUEMA DEL CITÓMETRO DE FLUJO FACSARIA II.	20
FIGURA 7: CLASIFICACIÓN DE COLORANTES FLUORESCENTES SENSIBLES A POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA.	23
FIGURA 8: MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIANTE ESPECTROFLUOROMETRÍA CONVENCIONAL.	27
FIGURA 9: EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN LA POBLACIÓN DE ESPERMATOZOIDES NO CAMBIA DURANTE 5 HORAS DE CAPACITACIÓN.	28
FIGURA 10: EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN LA POBLACIÓN DE ESPERMATOZOIDES NO CAMBIA DURANTE 13 HORAS DE CAPACITACIÓN.	29
FIGURA 11: ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS PRESENTAN UN AUMENTO EN EL $\text{pH}_i$ .	31
FIGURA 12: EL CALCIO DEL ESPERMATOZOIDE DE HUMANO AUMENTA DURANTE LA CAPACITACIÓN.	32
FIGURA 13: MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO UTILIZANDO TRES INDICADORES FLUORESCENTES.	34
FIGURA 14: OCURRE UNA HIPERPOLARIZACIÓN DURANTE LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO NO AGREGADOS Y VIVOS.	36
FIGURA 15: LA CAPACITACIÓN PRODUCE UNA HIPERPOLARIZACIÓN QUE VARÍA DE ACUERDO AL DONADOR.	38
FIGURA 16: EXISTE UNA CORRELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE CÉLULAS HIPERPOLARIZADAS Y EL PORCENTAJE DE CÉLULAS CON AUMENTO DE CALCIO.	39
FIGURA 17: EFECTO DE LA VALINOMICINA Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $\text{KCl}$ SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN ESPERMATOZOIDES.	40
FIGURA 18: ESPERMATOZOIDES VIABLES Y MOTILES DESPUÉS DE SEPARARSE MEDIANTE FACS.	42

## **ÍNDICE DE TABLAS:**

TABLA 1: PARÁMETROS ESTABLECIDOS POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.	16
TABLA 2: ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS TIENEN UN AUMENTO EN LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA PARA BCECF Y PARA FLUO3-AM.	33
TABLA 3: ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS TIENEN UN AUMENTO EN LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA PARA $\text{DiSC}_3(5)$ .	37

## **ANEXOS:**

TABLA (ANEXOS) 1: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES BCECF Y $\text{DiSC}_3(5)$ .	49
TABLA (ANEXOS) 2: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES $\text{DiSBAC}_2(3)$ Y DI-8-ANEPPS.	50
TABLA (ANEXOS) 3: DESCRIPCIÓN DE LOS INDICADORES FLUORESCENTES FLUO3-AM Y YODURO DE PROPIDIO.	51
TABLA (ANEXOS) 4: DESCRIPCIÓN DE INDICADORES FLUORESCENTES SENSIBLES A POTENCIAL DE MEMBRANA, CALCIO Y $\text{pH}_i$ , CORRELACIONANDO CON SU PAREJA DE INDICADOR DE VIABILIDAD.	52

## Abreviaturas

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio intracelular
<b>[Cl]<sub>i</sub></b>	Concentración de cloro intracelular
<b>[Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub></b>	Concentración de sodio extracelular
<b>AE</b>	Intercambiador aniónico (acrónimo del inglés <i>anion exchanger</i> )
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	Bario
<b>BCECF</b>	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxifluoresceína, Acetoximetil Ester
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina (acrónimo del inglés <i>bovine serum albumin</i> )
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CatSper</b>	Canal de cationes del espermatozoide (acrónimo del inglés <i>Cation Channel of Sperm</i> )
<b>CCCP</b>	Carbonil cianida m- clorofenilhidrazona (acrónimo del inglés <i>carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i> )
<b>CCO</b>	Células del cumulus oophorous.
<b>CFTR</b>	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (acrónimo del inglés <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i> )
<b>Em</b>	Potencial de membrana
<b>Em<sub>rep</sub></b>	Potencial de membrana en reposo
<b>ENaCs</b>	Canal de sodio epitelial (acrónimo del inglés <i>epithelial sodium channel</i> )
<b>ENR</b>	Envoltura nuclear redundante.
<b>FSC</b>	Dispersión frontal (acrónimo del inglés <i>forward scatter</i> )
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato
<b>Hv</b>	Canal de protones voltaje dependiente
<b>I. F</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>I. M. F</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canal de potasio sensible a ATP
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio

<b>K<sub>ir</sub></b>	Canal de potasio rectificador entrante rápido (acrónimo del inglés <i>Inwardly rectifying potassium</i> )
<b>MA</b>	Membrana Acrosomal
<b>MRH</b>	Medio de registro humano
<b>MP</b>	Membrana Plasmática;
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NBC</b>	Cotransportador Na <sup>2+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (acrónimo del inglés <i>sodium bicarbonate cotransporter</i> ).
<b>NHE</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> (acrónimo del inglés <i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger</i> )
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A (acrónimo del inglés <i>protein kinase A</i> ).
<b>PKT</b>	Proteína tirosina cinasa (acrónimo del inglés <i>protein tyrosine kinase</i> ).
<b>RA</b>	Reacción acrosomal
<b>sAC</b>	Adenilato ciclasa soluble (acrónimo del inglés <i>Soluble adenylyl cyclase</i> )
<b>sNHE</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> (acrónimo del inglés <i>sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger</i> )
<b>SSC</b>	Dispersión lateral (acrónimo del inglés <i>side scatter</i> )
<b>TEA</b>	tetraetilamonio
<b>Val</b>	Valinomicina
<b>ZP</b>	Zona pelúcida

## Glosario

**Acrosoma:** Organelo situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas hidrolíticas

**Axonema:** Complejo de filamentos axiales en el centro del flagelo del espermatozoide. Consiste en un anillo de nueve dobletes de microtúbulos y un par central.

**Capacitación:** Proceso de maduración al que el espermatozoide debe someterse con el fin de penetrar el gameto femenino y fecundarlo.

**CatSper:** Canal de calcio de expresión preferente de células espermatogénicas y espermatozoides. Activado por alcalinización intracelular.

**Células del *cumulus oophorus*:** Capa densa de células alrededor del óvulo maduro.

**Células de la granulosa:** Células que forman capas que rodean el óvulo en el folículo.

**Citometría de flujo:** Técnica de análisis celular que implica la medición de las propiedades de dispersión de la luz y fluorescencia que poseen las células.

**Enzima hidrolítica:** Enzima que acelera reacciones en la que una sustancia se rompe en componentes más simples con moléculas de agua.

**Epidídimo:** Parte del tracto genital masculino en donde el espermatozoide continúa su maduración.

**Espermatozoide:** Célula haploide que constituye el gameto masculino. Altamente diferenciada cuya función es la formación de un cigoto al fusionarse con el gameto femenino.

**Fecundación:** Proceso mediante el cual dos gametos (masculino y femenino) se fusionan para generar un organismo genéticamente único.

**Flagelo:** Apéndice celular móvil que permite nadar al espermatozoide y otras células.

**Hiperactivación:** Evento del espermatozoide caracterizado por el incremento de velocidad, reducción en la linealidad, incremento de la amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral y un movimiento flagelar vigoroso.

**Hiperpolarización:** Cambio del potencial de reposo de la membrana en sentido de hacerse más negativo.

**Movilidad hiperactivada:** Patrón de movilidad, caracterizado por un batido flagelar asimétrico, lento y con una mayor amplitud.

**Movilidad activada:** Patrón de movilidad, producido después de la eyaculación en el tracto genital femenino, caracterizado por un batido flagelar simétrico con amplitud pequeña y direccionalidad recta.

**Oviducto:** Tubo entre el ovario y el útero, a través del cual el óvulo es transportado para que se lleve a cabo la fecundación. Este consiste en dos partes: el istmo (la parte estrecha más cercana al útero) y la ámpula (la parte ancha más cercana al ovario).

**Óvulo:** Célula haploide que constituye el gameto femenino. Su función es la formación de un cigoto al fusionarse con el gameto masculino.

**Pieza media:** Región del flagelo de espermatozoide con material mitocondrial donde se genera el ATP.

**Potencial de membrana:** Diferencia de voltaje a través de una membrana debido a una diferencia de iones del interior y exterior de la célula.

**Quimiotaxis:** Movimiento de células en dirección al gradiente quimioattractante.

**Reacción Acrosomal:** Liberación de enzimas hidrolíticas en la parte superior de la cabeza del espermatozoide.

**Slo3:** Canal de potasio de expresión exclusiva en células espermatogénicas y en espermatozoides. Activado por alcalinización intracelular y por cambios en el voltaje.

**Termotaxis:** Movimiento de células que se direcciona de acuerdo al gradiente de temperatura.

**Zona Pelúcida:** Capa externa que rodea al óvulo de mamíferos, compuesta de glucoproteínas. Su función es la protección del gameto femenino.

## Resumen

La fecundación es un evento crucial para los organismos de reproducción sexual. Antes de que ocurra la fecundación, en el gameto masculino deben ocurrir tres cambios morfofisiológicos: 1) la activación de la movilidad, 2) la capacitación y 3) la reacción acrosomal (RA).

Durante la capacitación, el espermatozoide experimenta una serie de cambios fisiológicos que ocurren durante el tránsito en el tracto genital femenino. Este proceso implica una serie de eventos, por ejemplo: los cambios en la distribución de los lípidos de la membrana plasmática, cambios en las concentraciones de iones intracelulares y en los parámetros de la movilidad.

En varias especies de mamíferos se ha reportado que durante la capacitación se hiperpolariza la membrana plasmática del espermatozoide y que se requiere este evento para la fecundación. Sin embargo, no es claro si este cambio también sucede en los espermatozoides de humano.

Existe un solo reporte en espermatozoides de humano, que muestra que espermatozoides capacitados experimentan una ligera hiperpolarización. Sin embargo en este trabajo no se muestran controles ni un análisis estadístico apropiado. Por tal motivo el objetivo principal de este proyecto fue determinar si ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana durante capacitación en espermatozoides de humano.

Las mediciones del potencial de membrana mediante citometría de flujo nos permitieron detectar una subpoblación de células que se hiperpolariza durante el proceso de capacitación. Estos resultados son muy importantes, ya que se podrían estudiar con mayor detalle las entidades responsables de la hiperpolarización, lo que permite una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide de humano. Este conocimiento podría ser útil para resolver problemas de infertilidad y/o el desarrollo de un anticonceptivo masculino.



## **Abstract**

Fertilization is a crucial event for sexually reproducing organisms. Before fertilization occurs, in the male gamete, three morphophysiological changes must occur: 1) activation of motility, 2) capacitation and 3) the acrosome reaction (RA).

During capacitation, the sperm undergoes a series of physiological changes that occur during transit in the female genital tract. This process involves a series of events, for example: changes in the distribution of lipids of the plasma membrane, changes in intracellular ion concentrations and in motility parameters.

In some mammalian species it has been reported that during capacitation the sperm plasma membrane hyperpolarizes and that this event is required for fertilization. However, it remains unclear whether this change also occurs in human sperm.

There is only one report in human sperm, showing that capacitated sperm undergo a small hyperpolarization in the plasma membrane potential that a hyperpolarization occurs. Nevertheless, in this work there are neither controls nor appropriate statistical analysis. Therefore, the principal aim of this project was to determine if there is a hyperpolarization of the membrane potential during capacitation in human sperm.

Measurements of membrane potential by flow cytometry allowed us to detect a subpopulation of cells that undergoes a hyperpolarization during the capacitation process. These results are very important, as the entities responsible for the hyperpolarization could be studied in more detail, allowing a better understanding of human sperm physiology. This knowledge could be useful to solve infertility problems and/or to develop a male contraceptive.

# Introducción

## **La fecundación**

La fecundación es el evento más importante para los organismos de reproducción sexual. Es un proceso biológico altamente modulado, en el cual dos gametos haploides, el gameto masculino (espermatozoide) y el gameto femenino (óvulo) se unen para producir un cigoto que generará un organismo genéticamente único [1], [2].

Hoy en día no se han dilucidado por completo los eventos que regulan la fecundación. Existe la necesidad de estudiar con detalle estos acontecimientos por dos motivos: el primero de ellos, es porque hay necesidad de encontrar anticonceptivos para asegurar una adecuada planificación familiar que permita elegir el momento de la procreación, así como para aminorar el crecimiento insostenible de la población. Y el segundo, se debe a la prevalencia de la infertilidad en las parejas que se considera un problema medico-social de la salud reproductiva a nivel mundial, lo que hace importante el estudio profundo de los eventos que regulan la fecundación.

Ambos gametos son de vital importancia para este proceso, sin embargo en este proyecto nos enfocamos únicamente al gameto masculino.

## **El Gameto Masculino Humano (Espermatozoide)**

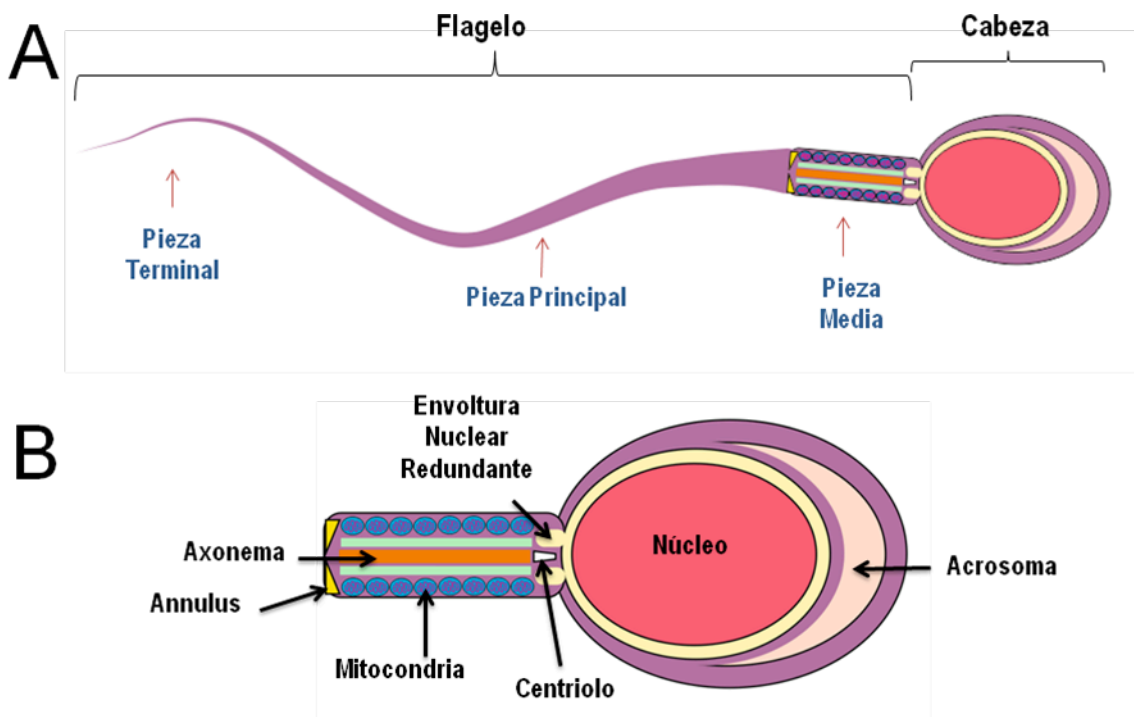
En 1677, el científico Van Leeuwenhoek descubrió al espermatozoide, al cual denominó “animalacula” (revisado en [3]). Desde entonces esta célula ha sido motivo de continuo estudio.

El espermatozoide de los mamíferos se divide en dos partes: la cabeza y el flagelo (constituido por la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal) (Figura 1). El espermatozoide de humano mide aproximadamente  $\sim 55 \mu\text{m}$ . La cabeza contiene un núcleo condensado (con 23 cromosomas), dos centriolos, el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (ENR). Los dos últimos organelos mencionados se consideran reservorios de calcio. Se ha confirmado que el acrosoma deriva del aparato de Golgi [4]. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina, la

hialuronidasa y muchas otras enzimas hidrolasas y esterasas, que al liberarse facilitan la penetración y la unión con el óvulo [3].

El flagelo confiere la movilidad a esta célula, a través de una maquinaria denominada axonema. Las mitocondrias se localizan únicamente en la pieza media, lo que limita la fosforilación oxidativa a este segmento. Por el contrario, la glucólisis se restringe al segmento más largo del flagelo (pieza principal), donde se encuentran las enzimas glucolíticas que participan en este proceso [5].

Los espermatozoides carecen de ribosomas, retículo endoplasmático y de aparato de Golgi [6].



**Figura 1: Esquema del espermatozoide del humano.**

A) Estructura del espermatozoide, compuesto por la cabeza y el flagelo (la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal), con una longitud de  $\sim 55 \mu\text{m}$ .

B) Se muestran los componentes principales de la cabeza ( $\sim 4 \mu\text{m}$ ) y de la pieza media del espermatozoide. El axonema se encuentra a lo largo de todo el flagelo.

Una vez que los espermatozoides entran al tracto genital femenino, deben ocurrir tres eventos que le permitirán fecundar al óvulo: 1) la activación de la movilidad, 2) la capacitación y 3) la reacción acrosomal (RA) [6].

## La activación de la movilidad

En los testículos, los espermatozoides de mamífero están inmaduros y no tienen movilidad. Hasta que se transportan a través del epidídimo adquieren la capacidad de movimiento, pero la activación de la movilidad se da después de la eyaculación en el tracto genital femenino debido, en parte, al incremento del pH intracelular que experimentan durante su trayecto.

Inicialmente, los espermatozoides presentan un batido flagelar simétrico con amplitud pequeña, a este patrón de nado progresivo con una direccionalidad casi recta se le conoce como “movilidad activada” [7].

En el año de 1970, Yanagimachi reportó que espermatozoides de hámster localizados en el ámpula del oviducto, presentan un nado extremadamente activo, y propuso que este tipo de movilidad aumenta la posibilidad de que los espermatozoides atraviesen las células del *cumulus oophorus* (CCO), la *zona pelúcida* (ZP) y fecunden el óvulo [8], [9]. Este tipo de movilidad se caracteriza por un batido flagelar asimétrico, lento, con una mayor amplitud y se le denominó “movilidad hiperactivada”. La hiperactivación es un proceso esencial para que los espermatozoides fecunden los óvulos. Una de las funciones fisiológicas de la hiperactivación es asegurar un movimiento progresivo que favorezca el desplazamiento aún en fluidos viscosos, como el moco cervical, además favorece la penetración de la ZP como se reportó en el modelo del hámster [10]. Se ha propuesto que el espermatozoide se desplaza dentro del ámpula del oviducto, por medio de termo y quimiotaxis [11].

La movilidad del espermatozoide es un proceso que depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha demostrado que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  está mediado por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia CatSper (Cation Channel of Sperm), canales expresados preferencialmente en el espermatozoide que se localizan en la pieza principal del flagelo y se activan por la alcalinización intracelular. El papel del canal CatSper

está relacionado principalmente con la hiperactivación, ya que los espermatozoides del ratón nulo para CatSper no se hiperactivan, produciendo el fenotipo de infertilidad.

## La capacitación

El término capacitación fue acuñado por C.R. Austin en el año de 1951, descrito como los cambios fisiológicos en los espermatozoides que ocurren dentro del tracto genital femenino necesarios para fecundar a los óvulos [1].

Este proceso involucra una serie de eventos entre los que destacan cambios en la distribución en los lípidos de la membrana [12], así como cambios en las concentraciones de iones intracelulares y en la movilidad de los espermatozoides (Figura 2).

Se ha reportado que la albúmina sérica presente en el tracto genital puede ser responsable de la remoción del colesterol de la membrana plasmática que ocurre durante la capacitación, modificando la fluidez de la membrana [13], favoreciendo la permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , dos compuestos esenciales para la capacitación [14].

El espermatozoide, al entrar al tracto genital femenino se enfrenta a un nuevo ambiente, el cual tiene una mayor concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (hasta cinco veces más), generando un incremento de  $\text{HCO}_3^-$  intracelular en el espermatozoide. Aún no es claro que entidades moleculares participan en este incremento, pero se ha propuesto que se debe, al menos parcialmente a la actividad del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC por sus siglas en inglés). Se ha destacado que el ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  pudiera también relacionarse con la regulación de cloro intracelular  $[\text{Cl}]_i$ , mediante la participación de los intercambiadores aniónicos (AE por sus siglas en inglés), que intercambian  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  [15], [16].

Otro cambio que ocurre durante la capacitación es la fosforilación de proteínas [17]. Se sabe que durante la capacitación existe un aumento en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) sintetizado por la adenilato ciclasa soluble (sAC). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) desencadenando una serie de

eventos aun no claros, finalizando en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina [18], aunque las cinasas que median este evento aun no se identifican.

La capacitación también se caracteriza por el aumento en la concentración de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ . Esto puede deberse al influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de CatSper o por la liberación de  $Ca^{2+}$  de las pozas internas [19].

Durante la capacitación aumenta el pH intracelular y se ha sugerido que en los espermatozoides de varias especies, este cambio podría estar regulado tanto por el canal de protones voltaje dependiente (Hv), como por intercambiadores  $Na^+/H^+$  (NHE) que se expresan exclusivamente en el espermatozoide (sNHE) [20], [21]. Estos intercambiadores contienen un sensor de voltaje putativo, es decir, cambios en el potencial de membrana podrían activarlos. Los sNHE se encuentran en la pieza principal del flagelo. Tanto NHE1 y NHE5 se expresan también en los espermatozoides. Los ratones machos que carecen de NHE1 son fértiles [22], pero los ratones nulos para sNHE son infértiles, destacando la importancia de este último [23].

El aumento del pH es relevante en la vía de señalización de la capacitación ya que existen algunos canales que se activan por el aumento del pH, como el Catsper y el canal Slo3 (ver más adelante), que tienen un papel crucial para que se lleve a cabo la fecundación.

## **El potencial de la membrana plasmática cambia durante la capacitación**

Como se mencionó anteriormente, durante la capacitación ocurren una serie de cambios importantes que habilitan al espermatozoide para fecundar al óvulo, este trabajo se enfoca principalmente en la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación.

La diferencia de potencial en ambos lados de la membrana se genera por las diferencias de concentración de iones dentro y fuera de la célula y por diferencias en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que da como resultado un potencial eléctrico, conocido como potencial de membrana en reposo ( $E_{m_{rep}}$ ).

Se ha reportado una hiperpolarización durante la capacitación en espermatozoides de los murinos, los lepóridos, los bovinos, y los equinos [24–27]. La hiperpolarización se produce cuando la diferencia de potencial eléctrico entre los dos lados de una membrana plasmática se hace más negativo, lo que significa que la carga en el interior de la membrana celular es más negativa que la carga en el exterior de la membrana. Los espermatozoides no capacitados tienen un potencial de membrana ( $E_m$ ) relativamente depolarizado, alrededor ( $\sim -35$  a  $-45$  mV) y durante la capacitación se hiperpolariza hasta unos ( $-80$  mV) [28], [29]. El potencial registrado en la hiperpolarización se acerca al potencial de equilibrio de potasio ( $K^+$ ) ( $-90$  mV) (revisado en [30]) sugiriendo que los canales de  $K^+$  son de gran importancia en la fisiología del espermatozoide y se cree que al menos en parte, podrían ser responsables de esta hiperpolarización.

El mecanismo de la hiperpolarización no se entiende muy bien todavía, pero podemos plantear que la hiperpolarización podría deberse a la apertura de canales de  $K^+$ , permitiendo el flujo de iones  $K^+$  a favor del gradiente electroquímico (revisado en [31]), y a la reducción de la permeabilidad de sodio ( $Na^+$ ) por disminución de la actividad de canales de  $Na^+$  (ver más adelante).

Se ha demostrado que la hiperpolarización asociada a la capacitación se inhibe usando bloqueadores como el bario ( $Ba^{2+}$ ) que inhibe los canales de  $K^+$  rectificadores entrantes ( $K_{ir}$ ) y las sulfonilureas (tolbutamida y glibeclamida) inhiben canales de  $K^+$  regulados por ATP ( $K_{ATP}$ ), lo que sugiere una participación de estos canales de  $K^+$  en la hiperpolarización asociada a la capacitación [29],[32].

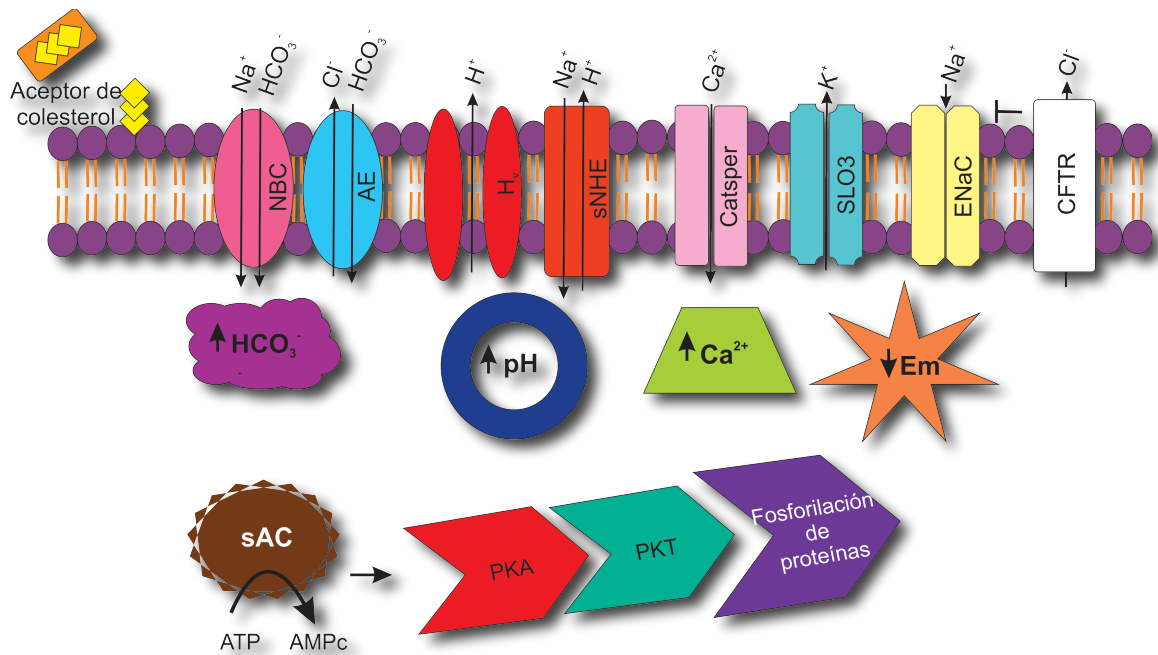
Hoy en día, se sabe que el canal de  $K^+$  Slo3 se encuentra altamente expresado en espermatozoides de mamífero, incluyendo el ratón y el humano, además que representa un nuevo tipo de canales de  $K^+$  regulado por el  $pH_i$  y por el voltaje, que podría estar involucrado en la capacitación y en la RA [33]. Se ha demostrado que el mSlo3 juega un papel crucial para la fecundación, debido a que ratones Slo3  $-/-$  son infértiles, ya que los espermatozoides presentan diversos defectos como cambios en su morfología, formando una horquilla en condiciones capacitantes, además de la imposibilidad de llevar a cabo la hiperpolarización durante la capacitación, entre otros [34].

Hallazgos experimentales sugieren que el potencial de reposo ( $E_{m_{rep}}$ ) del espermatozoide de ratón también depende de la concentración de sodio extracelular  $[Na^+]_e$  que permea a través de los canales de  $Na^{2+}$  epiteliales (ENaCs) que estarían constitutivamente activos en espermatozoides no capacitados y se cerrarían durante la capacitación, probablemente a través de una regulación mediada por canales CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) como ocurre en otros tipos celulares [35].

La importancia de la hiperpolarización se ha relacionado con varios eventos como son: 1) la activación de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes lo que permitiría que estén listos para abrirse mediante una despolarización inducida por la ZP culminando con la RA (ver más adelante) [28], [36]; 2) la hiperpolarización puede activar los intercambiadores  $Na^+/H^+$  (sNHE) y de esta manera aumentar el  $pH_i$ , lo que a su vez, podría estimular la sAC y a los canales Slo3 y CatSper [37]; 3) la hiperpolarización en conjunto con el gradiente electroquímico del ión  $Ca^{2+}$ , favorecen la entrada de  $Ca^{2+}$ , aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  en el interior, lo cual es importante para la hiperactivación y RA; 4) la hiperpolarización es suficiente y necesaria para preparar al espermatozoide para la RA sin que ocurran otros eventos de la capacitación, como el aumento de la fosforilación de tirosina [38].

A pesar de que esta hiperpolarización parece jugar un papel muy importante en la fisiología del espermatozoide, a la fecha no hay evidencia clara de que ocurra una hiperpolarización de la membrana en el espermatozoide de humano durante capacitación. Existen reportes del valor del potencial de reposo del espermatozoide de humano en diversas condiciones [39], [40], pero hay un solo reporte en donde comparan directamente el valor entre los estados no capacitados y capacitados y muestran una hiperpolarización pequeña durante capacitación, sin embargo este trabajo no muestra controles ni un estudio estadístico apropiado [41]. Probablemente no se reportado dicha hiperpolarización debido a que solo una fracción pequeña de los espermatozoides se capacita a diferencia de los espermatozoides de ratón [42].





**Figura 2: Eventos de señalización en la capacitación.**

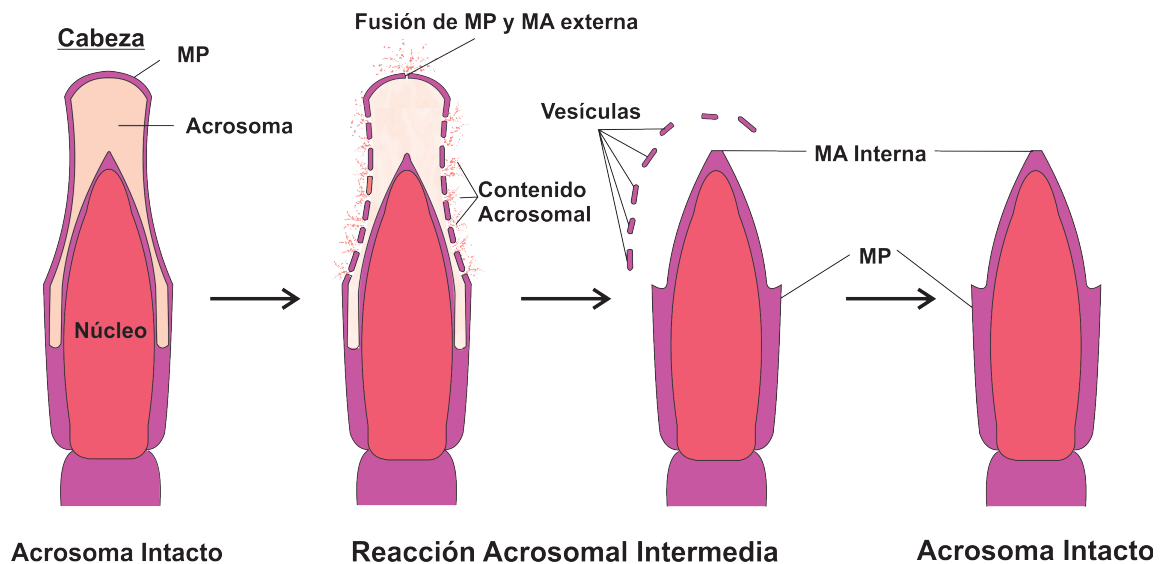
Se ilustran los eventos más importantes que ocurren durante la capacitación como son: la remoción del colesterol por un aceptor del colesterol, la captación de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) a través del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) y del intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE), el aumento del pH debido a los canales  $\text{H}_v$  y sNHE. El incremento del  $\text{HCO}_3^-$  activa la sAC que desencadena una serie de eventos que culminan en la fosforilación de proteínas. El aumento en pH puede contribuir a la activación de CatSper permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se esquematizan a los canales SLO3, ENaC y CFTR como posibles participantes durante la hiperpolarización de la membrana plasmática.

## La reacción acrosomal

La reacción acrosomal es el proceso por el cual se produce la exocitosis del acrosoma, fusionándose la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa (Figura 3), permitiendo por un lado la liberación de un conjunto de enzimas como la hialuronidasa que permiten la penetración de la *zona pelúcida* (ZP) y por otro la exposición de una membrana con características fusogénicas.

La ZP3 se ha considerado como el principal inductor fisiológico de la RA de los espermatozoides del mamífero [43]. Sin embargo en el humano la ZP1, ZP4 y diversas sustancias que se encuentran en el tracto genital femenino como la

progesterona, el GABA, la acetilcolina, el EGF entre otros pueden inducir a la RA [44], [45], de hecho aún no se sabe con certeza cuál es el inductor fisiológico de la RA y es un tema que está bajo intenso estudio.



**Figura 3: Modelo de reacción acrosomal.**

En la figura se muestra la cabeza de un espermatozoide, mostrando el origen de la reacción acrosomal por múltiples fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, lo cual genera vesículas híbridas a partir de estas membranas y permite la liberación del contenido acrosomal MP: Membrana Plasmática; MA: Membrana Acrosomal (modificado de: [46]).

## Planteamiento del Problema

El estudio de la fecundación ha usado como modelo principal al ratón y muchos de los eventos se han extrapolado a la especie humana. Si bien existen muchas coincidencias en ambas especies, cada vez es más claro que hay diferencias importantes en este proceso. La hiperpolarización en espermatozoides de ratón se ha usado como un marcador para la capacitación. Sin embargo esto no está claro para el caso del espermatozoide de humano. La mayoría de las mediciones del potencial de membrana se han realizado mediante la medición de la fluorescencia

total de la población de espermatozoides, lo cual arroja un promedio de lo que ocurre en ese conjunto de células. Si además consideramos que la capacitación ocurre solamente en un 20-40% de los espermatozoides de humano [27], es probable que si el cambio en espermatozoides de humano es pequeño, estudios poblacionales impidan detectarlo. En este trabajo se utilizó la técnica de citometría de flujo para determinar si ocurre la hiperpolarización en los espermatozoides de humano y aprovechamos esta herramienta para separar poblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados, lo cual permitirá estudiar procesos como la movilidad y la RA en una forma más detallada.

## **Hipótesis**

Durante la capacitación del espermatozoides de humano el potencial de membrana plasmática se hiperpolariza.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Determinar si ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana durante la capacitación de espermatozoides de humano.

### ***Objetivos particulares***

- Determinar el potencial de membrana de espermatozoides capacitados y no capacitados mediante espectrofluorometría convencional.
- Determinar los parámetros adecuados para poder analizar espermatozoides de humano mediante citometría de flujo.
- Determinar el potencial de membrana de espermatozoides capacitados y no capacitados mediante citometría de flujo.
- Recuperar espermatozoides capacitados seleccionados por el cambio en potencial de membrana o cualquier otro parámetro que cambie durante la capacitación (pH, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, etc.).

## Metodología

### **Reactivos**

#### Medio no capacitante:

Se utilizó Medio Ham's F10 con bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (1.2 g/L) (Sigma-Aldrich, #cat: N6013).

#### Medio capacitante:

Se utilizó el mismo medio Ham's F10 utilizado en condiciones no capacitantes, suplementándolo con Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, #cat: A7906) (5 mg/ml), cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich, #cat: C3881) (2 mM final).

#### Medio de registro para humano (MRH):

Solución en la cual se hicieron los registros de fluorescencia en el espectrofluórometro convencional y en el citómetro de flujo. Esta solución debe tener un pH= 7.4 y contiene los siguientes reactivos:

#### **Medio de Registro para Humano**

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (mM)</b>
D-Glucosa	5
Hepes	10
KCl	4
Lactato de Sodio	10
$\text{MgCl}_2$	1
NaCl	120
$\text{NaHCO}_3$	15
Piruvato de Sodio	1
$\text{CaCl}_2$	2

#### Medición de calcio intracelular:

Se empleó Fluo3-AM (Invitrogen, #cat: F1242) (1 $\mu$ M final).

#### Medición de pH intracelular:

Se utilizó 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxifluoresceína, Acetoximetil Ester (BCECF-AM) (Invitrogen MP, #cat: B1170) (0.5 $\mu$ M final)

#### Medición de potencial de membrana:

Se utilizaron los siguientes reactivos:

Indicadores fluorescentes:

- DiSC<sub>3</sub>(5) (Invitrogen, #cat: D306) (50 nM y 1  $\mu$ M)
- DiSBAC<sub>2</sub>(3) (Anaspec, #cat: 84702) (50 nM)
- Di-8-Anepps (Invitrogen LT, #cat: D3167) (50 nM)

Para disipar el potencial de membrana mitocondrial se aplicó carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich, #cat: C2759) (0.5  $\mu$ M). Para determinar el potencial de membrana mediante la calibración se empleó valinomicina (Val) (ICN, #cat: 10501005) (1  $\mu$ M) y cloruro de potasio (KCl) (Sigma, #cat: P3911) (10, 20, 40, 60 y 70 mM)

#### Determinación de la viabilidad:

Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó el colorante yoduro de propidio (Invitrogen, #cat: L-7011) (1 – 1.2  $\mu$ M).

Como control positivo para espermatozoides muertos se utilizó 0.1% de tritón X-100 (t-Octilfenoxipolietoxietanol) (Sigma-Aldrich, #cat: X100).

\*Ver descripción de indicadores fluorescentes (BCECF-AM, Fluo3-AM, DiSC<sub>3</sub>(5), DiSBAC<sub>2</sub>(3), Di-8-Anepps en Tabla (Anexos) 1, 2 y 3.

#### Calibración de los citómetros de flujo:

Se utilizaron las perlas CS&T (BD Becton Dickinson, #cat: 655050) y para la separación se usaron las perlas accudrop (BD Becton Dickinson, #cat: 345249).

## **Equipos**

Para las mediciones de potencial de membrana en población utilizamos el espectrofluorómetro de la marca SLM-AMINCO (SLM instruments, #Cat: JD-490) operado por el software de adquisición “OLIS GlobalWorks”.

Para las mediciones de calcio, pH y potencial de membrana en células individuales usamos citómetro de flujo FACSCanto II (BD Becton Dickinson, #Cat: 338960) y únicamente para separar poblaciones empleamos el citómetro de flujo FACSAria II cell sorter (BD Becton Dickinson, #Cat: 643178) acoplados al software FACSDiva™ V6. Para el análisis recurrimos al uso del software FlowJo (Tree Star, 9.3.3).

### **a) Obtención de la muestra de espermatozoides**

Se utilizaron espermatozoides de humano provenientes de donadores sanos que tuvieron al menos 2 días de abstinencia sexual y que cumplieron con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [47], como se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1: Parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud.**

Parámetro	Valor
Volumen	$\geq 1.5$ ml
pH	$\geq 7.2$
Concentración espermática	$\geq 15 \times 10^6$ células/ml
Cantidad total de espermatozoides	$\geq 39 \times 10^6$ células/eyaculado
Movilidad	$\geq 32\%$ con movilidad progresiva
Morfología	$\geq 4\%$ con morfología normal
Viabilidad	$\geq 58\%$ espermatozoides vivos

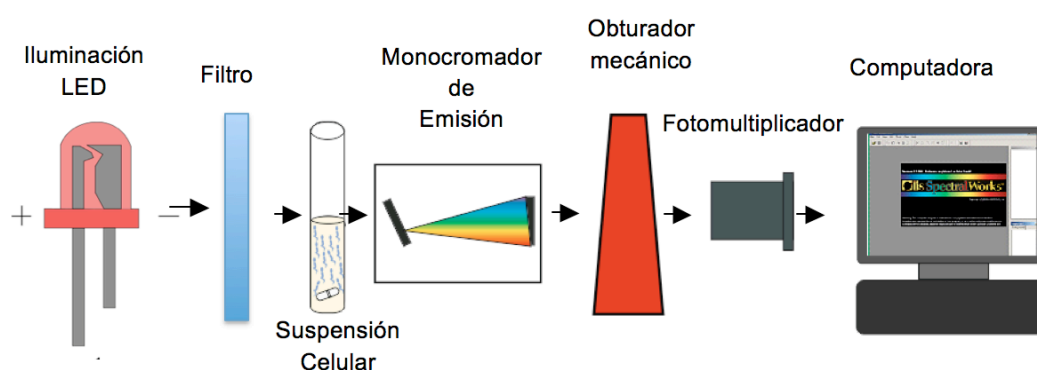
Las muestras de semen se colectaron en frascos de plástico estéril y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 30 minutos, tiempo requerido para licuar las muestras; es decir que la muestra pasó de ser viscosa a líquida.

Posteriormente se procedió a hacer el procedimiento de “Swim up” (nado hacia arriba), técnica que permite la selección de los espermatozoides con mayor movilidad. Para lo cual se adicionó 1 ml de cada muestra ya licuada y 1 ml de medio capacitante en un tubo de ensayo a una inclinación de 30°, esto para favorecer el nado de los espermatozoides y aumentar la superficie para recuperar un mayor número celular. Se incubaron a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 hora y se recuperaron 750 µl teniendo el cuidado de tomar el volumen de la parte superior del tubo (volumen que contenía espermatozoides con mayor movilidad) [48].

### **b) Capacitación**

Los espermatozoides recuperados en el paso anterior fueron capacitados *in vitro* incubándolos en el medio capacitante a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante al menos 4 horas. Sin embargo para poder ajustarnos a los tiempos de uso del citómetro de flujo, así como para explorar la dependencia del tiempo de capacitación el rango que usamos fue de 5 a 13 horas.

### **c) Espectrofluorimetría convencional**



**Figura 4: Esquema del espectrofluorómetro convencional.**

Componentes principales del equipo donde se realizan las mediciones del potencial de membrana y otras mediciones de fluorescencia, se utiliza un diodo LED de color rojo (640 ± 12.5 nm) como fuente de luz, un filtro para seleccionar la señal, utiliza un



monocromador de emisión de 670 nm, un obturador mecánico, un fotomultiplicador como detector de las señales. La información se almacena en una computadora.

La cuantificación de los cambios en el potencial de membrana en poblaciones de espermatozoides de humano, se realizó mediante el registro de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo en el espectrofluorómetro (Figura 4).

En la cámara de muestra del espectrofluorómetro se colocaron los tubos de ensayo, cada uno con  $3 \times 10^6$  espermatozoides de humano previamente cargados con DiSC<sub>3</sub>(5) (1  $\mu$ M final) resuspendidos en MRH. Una vez estabilizada la fluorescencia, se adicionó CCCP para disipar el potencial mitocondrial. Posteriormente para la calibración se utilizó Val y adiciones secuenciales de KCl a diferentes concentraciones y se adquirieron los valores de fluorescencia a una frecuencia de 0.5 Hz durante un tiempo de 1250 seg.

Para hacer el análisis, se obtuvieron los promedios de los datos de fluorescencia a partir de los valores de fluorescencia con respecto al tiempo correspondientes a cada adición (ya sea, CCCP, Val o las adiciones subsecuentes de KCl), después se hizo una regresión lineal a partir de los datos teóricos del potencial de equilibrio del K<sup>+</sup> con respecto a los experimentales, graficando y después se calculó el potencial de equilibrio para K<sup>+</sup> mediante la ecuación de Nernst:

$$E_K = RT/zF \cdot \ln [K^+]_e / [K^+]_i$$

Donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, Z es el número de cargas elementales en el ión y F la constante de Faraday. Suponiendo una concentración de 120 mM para K<sup>+</sup> intracelular y tomando en consideración las siguientes concentraciones de K<sup>+</sup> que corresponden también a los siguientes potenciales de equilibrio para K<sup>+</sup>:

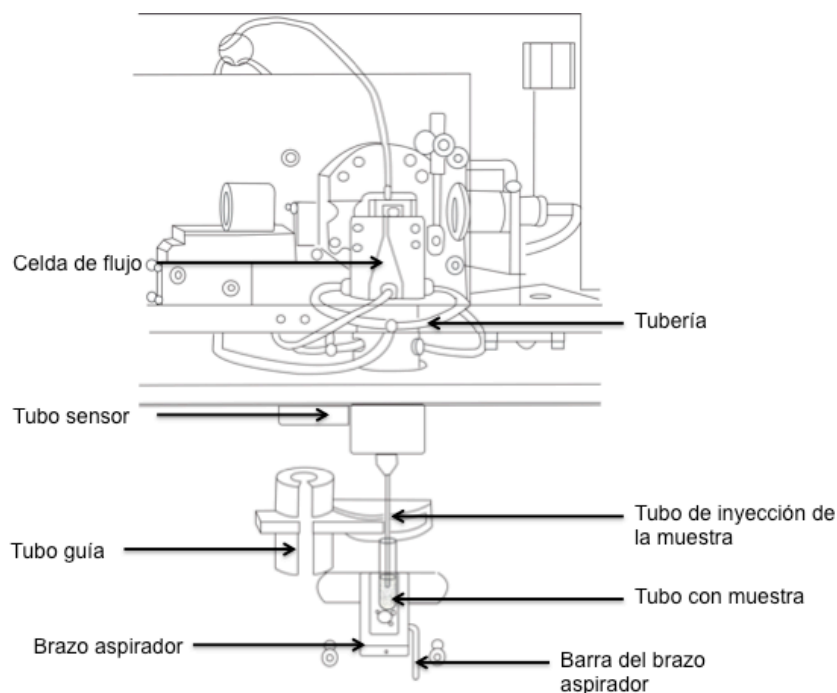
Adiciones de K <sup>+</sup> (mM)	Valores Teóricos (mV)
4	-91
5.25	-84
7.75	-73
12.75	-60
22.75	-44

Y considerando que la concentración extracelular de  $K^+$  es de 6 mM. Con estos datos y la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ) obtenida del ajuste por la regresión lineal, se calcula el potencial de membrana a partir de la siguiente ecuación:

$$E_m = b/m$$

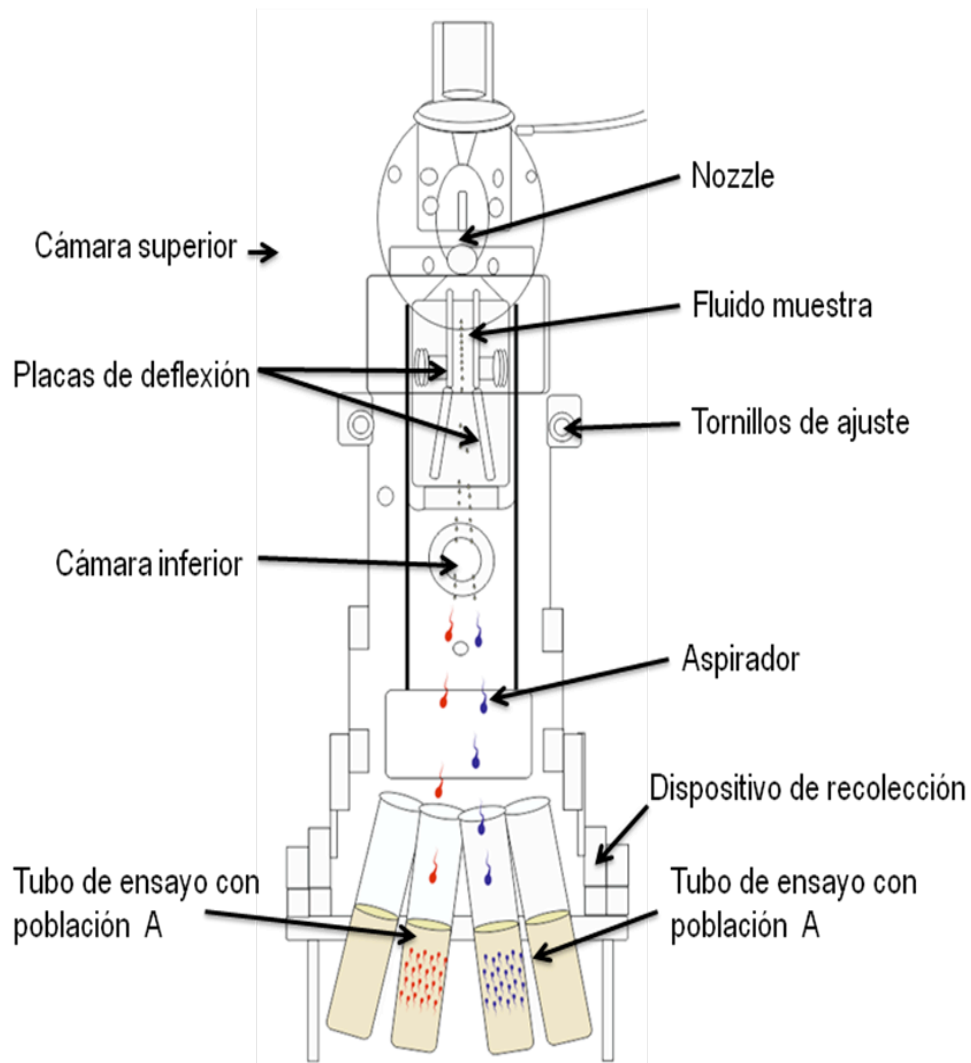
#### **d) Citometría de flujo**

La citometría de flujo permite el análisis multiparamétrico de poblaciones heterogéneas, ya que clasifica las células en función de su tamaño (dispersión frontal (FSC), complejidad o granularidad (dispersión lateral (SSC) y la intensidad de fluorescencia. Además que discrimina las partículas, detritos celulares u otros contaminantes para las mediciones de fluorescencia. Para las mediciones de los parámetros ( $Ca^{2+}$ , pH y potencial de membrana) se utilizaron dos diferentes citómetros de flujo: FACSCanto II (Figura 5) y FACSAria II (Figura 6), utilizamos el último para hacer la separación de células.



**Figura 5: Esquema del citómetro de Flujo FACSCanto II.**

Se muestran las partes que constituyen el equipo: Barra del brazo aspirados, brazo aspirador, tubo guía, tubo de inyección de la muestra, tubo sensor, las tuberías y la celda de flujo.



**Figura 6: Esquema del citómetro de flujo FACS Aria II.**

Se muestran las partes que constituyen el equipo: Nozzle (la cual contiene un anillo con diferentes diámetros 70, 85, 100 y 130  $\mu\text{m}$ ), placas de deflexión, tornillos de ajuste, las cámaras, el aspirador y el dispositivo de recolección que contienen los tubos de ensayo con las poblaciones separadas.

### ➤ **Calibración del equipo**

La calibración se realizó con perlas marcadas con una mezcla de fluorocromos que se excitan por los rayos láser ultravioleta, violeta, verde, azul y rojo, los cuales emiten fluorescencia que se registra en los detectores empleados en el citómetro de flujo. Algunas mezclas contienen perlas con tres niveles de intensidad de fluorescencia: brillante (bright), medio (mid) y opaco (dim). Para ambos citómetros se utilizan las perlas CS&T. Esta calibración tiene como finalidad maximizar la

resolución y establecer el ruido de fondo para descartarlo de los datos experimentales, esto independientemente del tipo celular a utilizar. Esta calibración se debe realizar aproximadamente cada 6 meses o cada vez que los resultados del control diario resulten en valores fuera de rango.

Una vez que se establece la línea base, se debe realizar diariamente el control de funcionamiento con las mismas perlas CS&T para estar alerta de posibles desviaciones del valor basal establecido.

#### ▪ **Control de calidad diario (CS&T)**

Es necesario obtener un control diario (cada que se realiza un experimento en el citómetro de flujo), para determinar variables que se calculan cuando se establece una línea base de los parámetros de complejidad, tamaño y fluorescencia para hacer comparativos en los experimentos. Con ayuda del software se pueden comparar estos datos del control de calidad diario y se genera un reporte con los valores y gráficas de Leving-Jennings donde se puede establecer la desviación estándar de la señal en cada detector con respecto a la media de la línea base.

#### ➤ **Compensación**

La compensación permite corregir la superposición que existe cuando se utilizan tinciones policromáticas con fluorocromos que tengan espectros de emisión similares. Esto se hizo de manera muy sencilla mediante el software FACSDiva y se adquirieron 5 000 eventos para las muestras control negativo (sin teñir) y muestras positivas para yoduro de propidio, a los espermatozoides se les incubó con tritón X-100 durante 10 min a temperatura ambiente y se les adicionó yoduro de propidio.

## ➤ **Adquisición**

Una vez que se corrieron los controles de compensación, se procede a adquirir todas las condiciones experimentales. Para todos los casos se grabaron de 10 000 a 20 000 eventos (células/condición) en el citómetro de flujo, diluyéndolas en MRH.

### ▪ **Medición de Calcio y pH intracelular**

Inicialmente, se realizaron medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH en citometría de flujo como control ya que se sabe que cambian durante el proceso de capacitación. Para la cuantificación de los incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y del  $\text{pH}_i$  en poblaciones tanto de espermatozoides no capacitados como capacitados, se cargaron con el indicador fluorescente a la concentración óptima determinada mediante una curva de titulación para determinar la concentración mínima de cada colorante para detectar los cambios de que ocurren durante la capacitación mediante esta metodología (ver concentraciones en la página 15). Para el caso del colorante sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  se incubaron durante 20 min y para el colorante sensible a cambios del pH se trataron por 7 min, se centrifugaron a 750 g por 5 min y finalmente se lavaron con MRH.

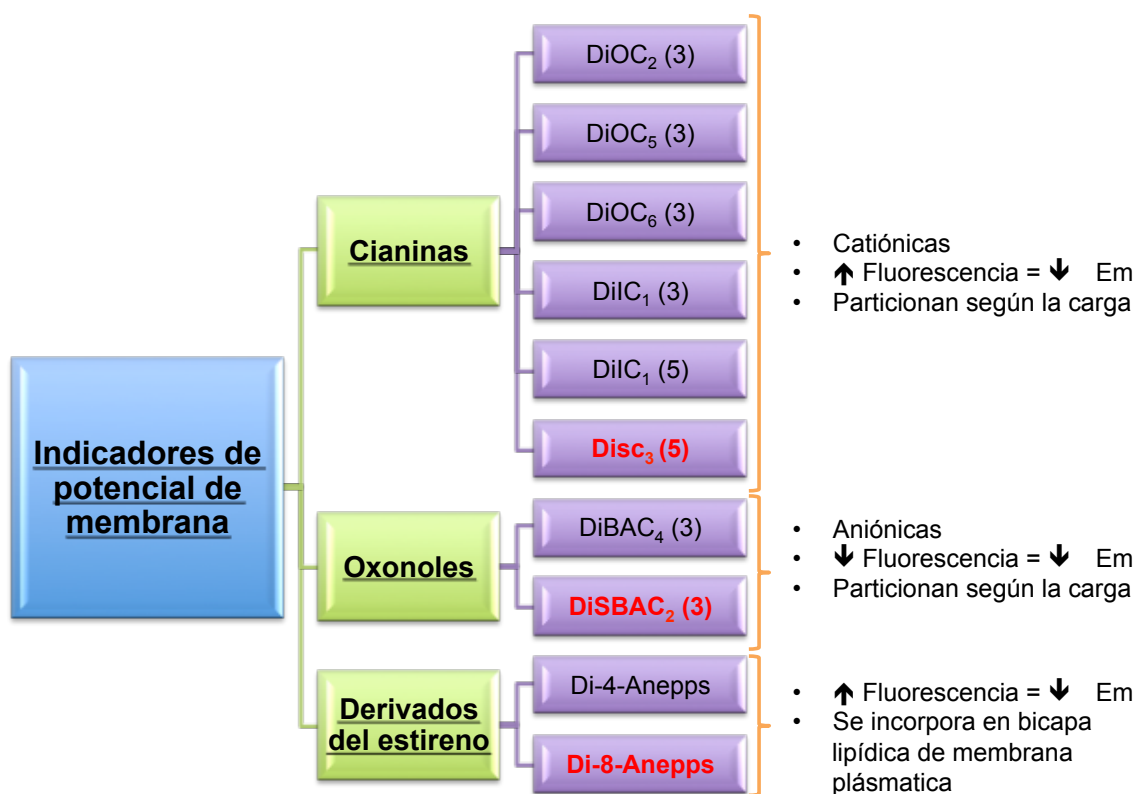
Fue posible la medición simultánea de la viabilidad celular utilizando yoduro de propidio (colorante impermeable, que también se incorpora a ácidos nucleicos, indicador de células muertas).

### ▪ **Medición de potencial de membrana**

Existe una amplia variedad de colorantes fluorescentes para la medición del potencial de membrana plasmática, los cuales se clasifican en cianinas, oxonoles y derivados del estireno, utilizamos un colorante de cada grupo para determinar la mejor opción en nuestro modelo de estudio, DiSC<sub>3</sub>(5), DiSBAC<sub>2</sub>(3) y Di-8-Anepps, respectivamente (Figura 7).

La estimación del potencial de membrana se realiza aprovechando la fluorescencia diferencial que muestran los colorantes al particionarse o incorporarse en las membranas celulares.

También se cargaron 3 min antes de adquirir los eventos mediante el citómetro de flujo con el indicador fluorescente a la concentración óptima determinada mediante una curva de titulación para cada colorante (ver concentraciones en la página 15).



**Figura 7: Clasificación de colorantes fluorescentes sensibles a potencial de membrana plasmática.**

Se muestran tres grupos principales: cianina, oxonoles y derivados del estireno. Cada grupo incluye diferentes compuestos y de estos se muestran sus distintas características. En rojo se muestran los indicadores utilizados en este trabajo en experimentos de citometría de flujo.

También se midió simultáneamente de la viabilidad celular según el colorante indicado de manera que no se superpongan las fluorescencias de cada colorante (Ver pareja de viabilidad en Tabla (Anexos) 4).

## ➤ **Análisis estadístico e interpretación de datos**

Mediante el software FlowJo se graficaron los datos obtenidos para cada condición por cualquiera de las siguientes modalidades: histograma de una dimensión, gráfica de puntos (Dot plot), gráficas de densidad, gráficas de contorno, etc.

En los histogramas de una dimensión o parámetro se representa el porcentaje normalizado de células o partículas, nombrado también % del máximo (% de Max) (en el eje de ordenadas) contra la intensidad de fluorescencia de un parámetro (en el eje de abscisas).

Las gráficas de puntos (Dot plot) corresponden a dos parámetros, representan en cada eje la intensidad de fluorescencia de un parámetro diferente. Las más comunes son las distribuciones de frecuencia de puntos donde cada punto representa a una partícula analizada, y la distribución de los puntos permite visualizar las contribuciones relativas de cada región de rangos de intensidad de fluorescencia.

Otra característica propia del análisis de datos de citometría de flujo es el uso de ventanas de análisis (“*gates*”). Establecer ventanas de análisis nos permitió seleccionar de manera específica la población de células o partículas de interés, normalmente en base a los parámetros de dispersión frontal y ortogonal de la luz, para simplificar el análisis de poblaciones heterogéneas en las que se analizaron simultáneamente un número elevado de parámetros.

La intensidad de la fluorescencia de los espermatozoides se analizó después de una selección basada en el tamaño o FSC-A (forward scatter - Area o dispersión frontal - Area) y la complejidad celular o SSC-A (side scatter - Area o dispersión lateral - Area), para excluir partículas contaminantes.

Se realizó un segundo filtro de selección, para excluir los dobletes o agregados, que fueron pasados al mismo tiempo por el láser. Se hizo una gráfica de FSC-A (forward scatter - Area o dispersión frontal - Area) contra FSC-H (forward scatter - Height o dispersión frontal - Altura). Las células que se excluyeron fueron aquellas

localizadas por debajo de la recta. Esto es porque las células en dobletes tienen el mismo FSC-H pero el doble de FSC-A (2x). Finalmente se analizó la fluorescencia para las células localizadas sobre la recta.

El software nos permite obtener datos específicos como media geométrica, moda, media, mediana y desviaciones estándar de poblaciones de interés.

### ➤ Separación de poblaciones

Las células de interés ya sea por un cambio en el  $\text{Ca}^{2+}$ , pH o en el Em, se seleccionan en un *gate* o ventana y se procede a separar bajo el parámetro establecido con ayuda del citómetro de flujo, controlado por el software. Se tomó como criterio de separación a la población capacitada viable (sólo vivas) que únicamente tuvo un cambio importante en la fluorescencia con respecto a la población no capacitada, es decir, que los histogramas se observara un desplazamiento hacia la derecha para todos los casos. Dicho desplazamiento es resultado de un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , así como un aumento del pH y una hiperpolarización del potencial de membrana.

Durante la separación de poblaciones, se generan gotas uniformes provenientes de un flujo continuo. El tiempo en que se genera la gota y la partícula es interceptada por el láser, esto se determina con el uso de las perlas FACS Accudrop. Cuando una partícula se detecta y cumple con los criterios de separación, se aplica una carga eléctrica a la gota. La atracción y repulsión electrostática causan que cada gota cargada se desvíe a la izquierda o derecha, dependiendo de la polaridad de carga de la gota, esto se debe a que pasan a través de un campo electrostático (alrededor de 2000 V) existente entre las placas de alto voltaje (placas deflectoras). Aquellas gotas atraídas hacia uno u otro polo portan un espermatozoide que puede ser o no de interés. Se recolectaron en tubos con 500  $\mu\text{l}$  de medio Ham's F-10 y MRH y se alineó el flujo de gotas de tal manera que al caer se desplazara por la pared del tubo, de esta forma se amortiguó el impacto de los espermatozoides contra el fondo del tubo, lo cual es muy importante ya que las gotas impactan sobre la superficie del tubo a más de 100 Km/h. Las partículas, detritos celulares u otros



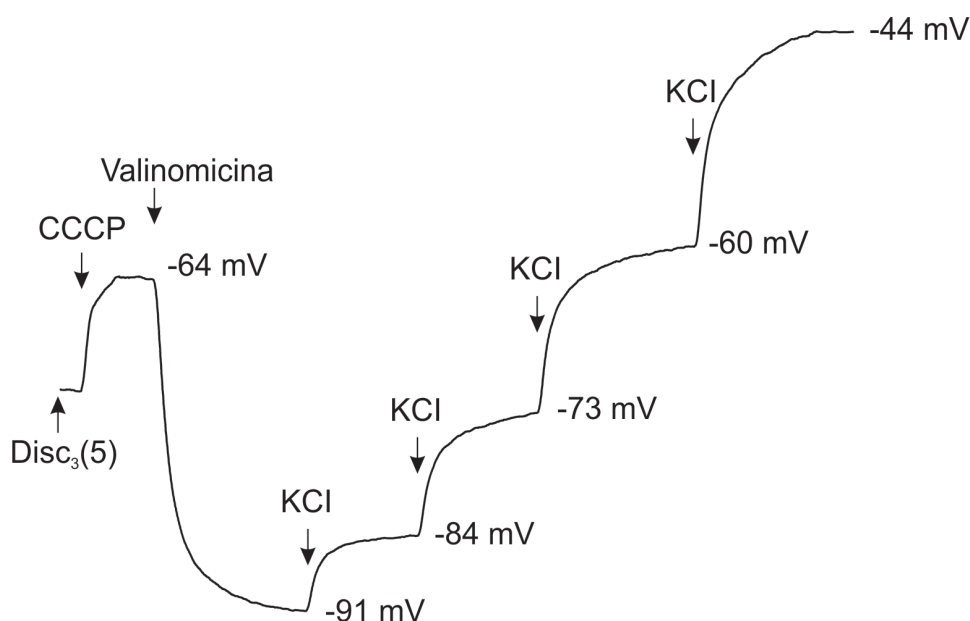
contaminantes, no cumplen las condiciones definidas para la población seleccionada, por lo que no reciben ninguna carga y se desechan. La velocidad de separación depende, entre otras cosas, de la presión a la que se haga pasar la muestra a través del citómetro y también depende del protocolo de presurización asignado.

Por último, fue necesario señalar que la eficiencia del proceso de separación espermática mediante citometría de flujo se debe evaluar teniendo en cuenta dos factores muy relacionados entre sí, como son el número de espermatozoides separados por unidad de tiempo (rendimiento) y la pureza de la población separada. Por eso fue indispensable separar el mayor número posible y evaluar la integridad de la célula, evitando la separación de flagelos de cabezas del espermatozoide.

## Resultados

### ***Medición de potencial de membrana en espectrómetro convencional***

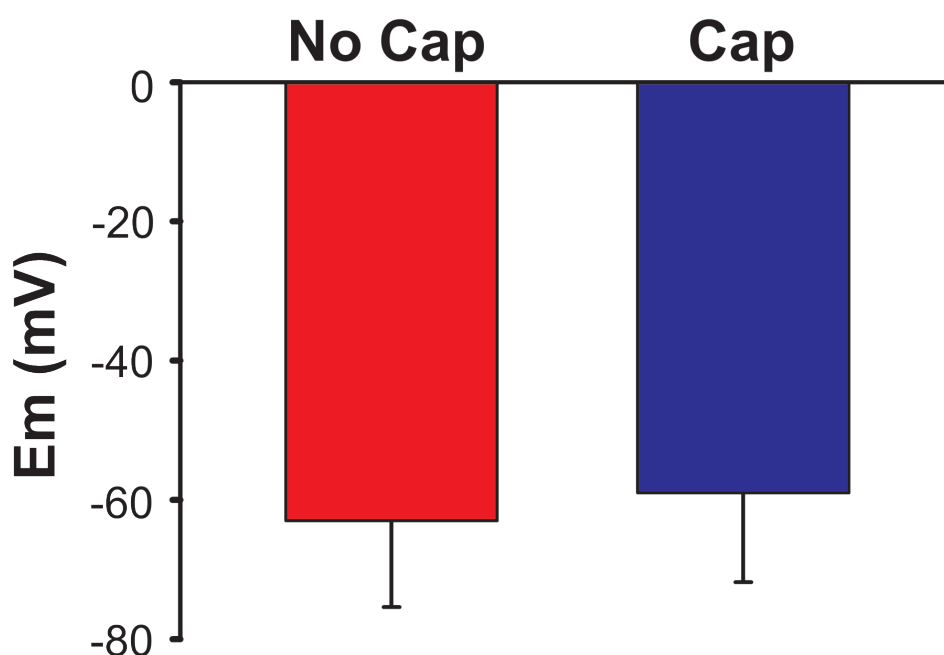
El objetivo principal de este proyecto fue determinar si ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana durante capacitación en espermatozoides de humano, por tal motivo se determinó el potencial de membrana mediante espectrofluorimetría convencional en espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes y capacitantes, utilizando como indicador fluorescente la cianina DiSC<sub>3</sub>(5), y el agente desacoplante CCCP, para disipar el potencial mitocondrial y con una calibración interna se aplicó valinomicina (Val) para hiperpolarizar el potencial de membrana y adiciones subsecuentes de KCl para determinar el potencial de membrana (Em) en cada condición, lo que depolariza el potencial de membrana (figura 8).



**Figura 8: Medición del potencial de membrana plasmática mediante espectrofluorometría convencional.**

Trazo representativo de la fluorescencia de espermatozoides capacitados cargados con DiSC<sub>3</sub>(5) (1  $\mu$ M). Aplicando CCCP para disipar el potencial de membrana mitocondrial y para una calibración interna se aplicó valinomicina para hiperpolarizar y adiciones subsecuentes de KCl que depolariza y de esta manera se determinó el Em. Los números ubicados a la derecha del trazo representan los potenciales de membrana estimados a partir de la ecuación de Nernst.

Se realizaron 21 experimentos independientes en el espectrofluorómetro a un tiempo de 5 horas. El análisis mostró que no hay un cambio significativo en el  $E_m$  entre espermatozoides no capacitados (No Cap) y capacitados (Cap) con valores promedio de -63 mV y -59 mV, respectivamente (figura 9). Estos datos sugieren que mediante la técnica espectrofluorimetría convencional no es posible detectar un cambio en el potencial de membrana plasmática.

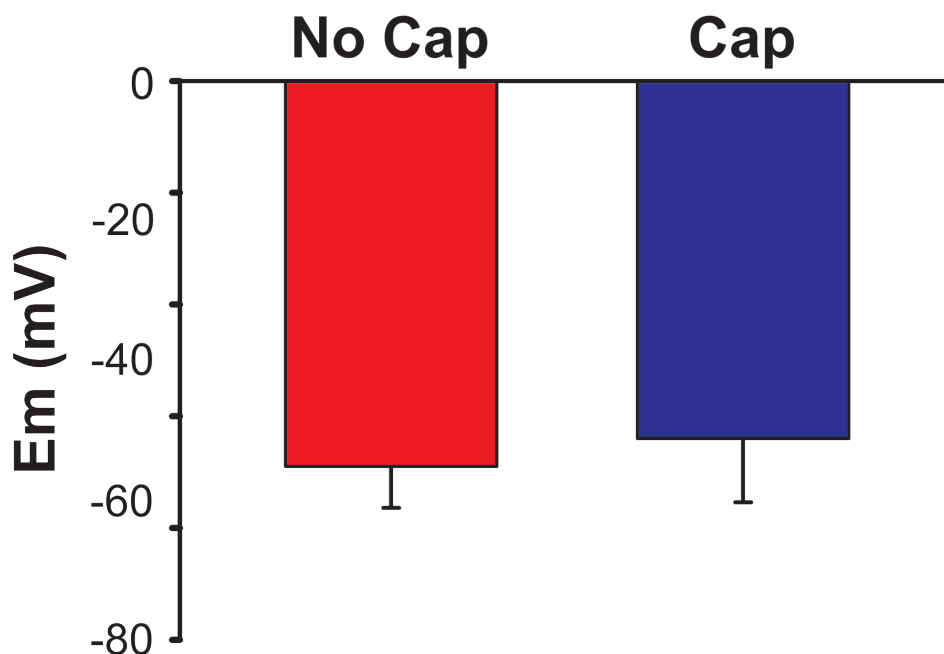


**Figura 9: El potencial de membrana en la población de espermatozoides no cambia durante 5 horas de capacitación.**

Cuantificación del potencial de membrana plasmática en espermatozoides no capacitados (No Cap) y capacitados (Cap) después de 5 horas de capacitación, usando el indicador fluorescente DiSC<sub>3</sub>(5) (1  $\mu$ M). Se determinó el  $E_m$  en cada condición a partir de la ecuación de Nernst (Sección Metodología), mediante una regresión lineal. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar (n=21). Estadísticamente no significativa por prueba de Tukey.

Posteriormente realizamos los mismos ensayos utilizando un mayor tiempo de capacitación, evaluamos un periodo de 13 horas, ya que recientemente en el

campo se cuestiona cuál es el tiempo necesario para capacitar los espermatozoides, considerando que pueden mantenerse viables en el tracto genital femenino aproximadamente 48 horas o incluso más [49]. Se realizaron 5 experimentos independientes donde tampoco se observó un cambio significativo (figura 10), se obtuvo valores promedio para no capacitados de -69 mV y para capacitados de -64 mV. Indicando que la medición de potencial mediante esta técnica a un tiempo de 13 horas, tampoco muestra una hiperpolarización en condiciones capacitantes, esto pudiera ser debido a que los datos arrojados son resultado de un promedio de toda la población, enmascarándose el resultado.



**Figura 10: El potencial de membrana en la población de espermatozoides no cambia durante 13 horas de capacitación.**

Cuantificación del potencial de membrana plasmática en espermatozoides no capacitados (No Cap) y capacitados (Cap) después de 13 horas de capacitación, usando el indicador fluorescente DiSC<sub>3</sub>(5) (1  $\mu$ M). Se determinó el Em en cada condición a partir de la ecuación de Nernst (Sección Metodología), mediante una regresión lineal. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar (n=5). Estadísticamente no significativa por prueba de Tukey.

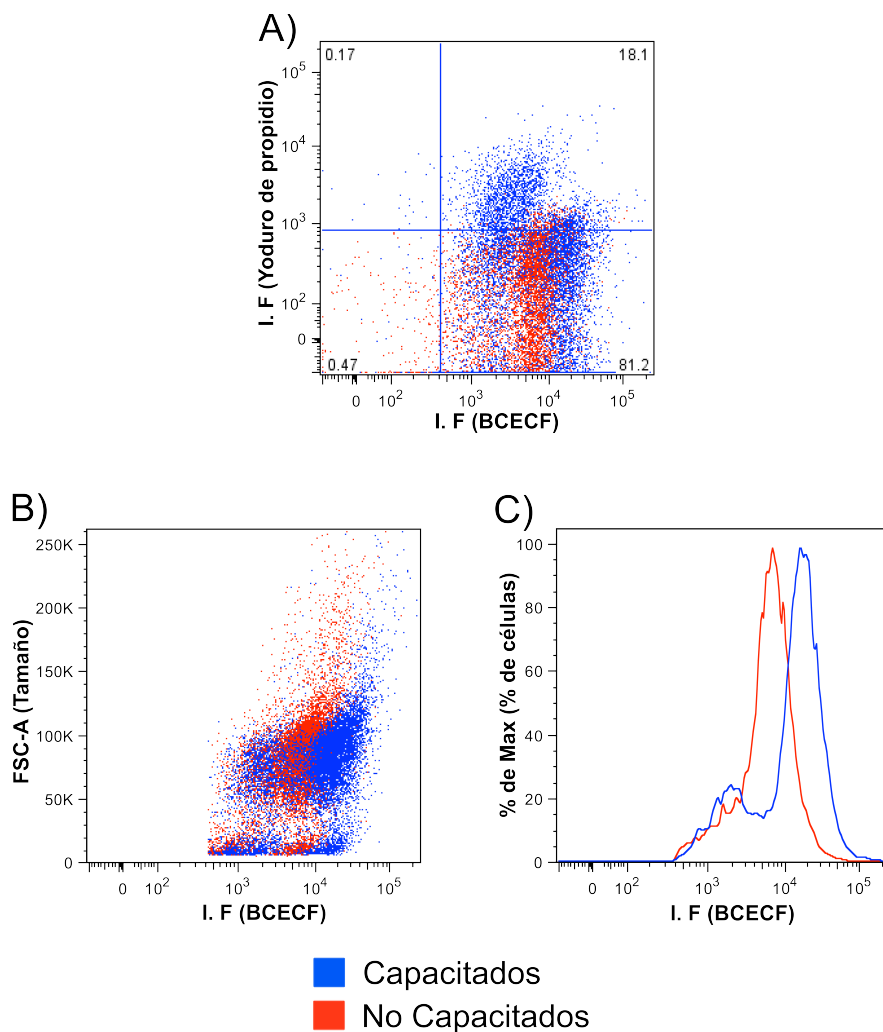
## ***Medidas de calcio y pH en citometría de flujo***

Como estrategia para validar que la técnica de citometría de flujo es capaz de detectar los cambios que se sabe ocurren durante la capacitación, se realizaron determinaciones de las  $[Ca^{2+}]_i$  y del  $pH_i$ , utilizando Fluo3-AM (1  $\mu$ M) y BCECF-AM (0.5  $\mu$ M) respectivamente; estos experimentos se realizaron en muestras de 7 donadores diferentes.

En el panel A de las figuras 11 y 12 muestran un gráfico de puntos de una doble tinción graficando la intensidad de fluorescencia (I. F) de sensible al pH (I. F (BCECF)) (figura 11) o sensible a cambios en el  $Ca^{2+}$  (I. F (Fluo3-AM)) (figura 12) contra yoduro de propidio (I. F (yoduro de propidio)), y se aprecia el gráfico ordenado con cuadrantes determinados por la fluorescencia de muestras no teñidas. Se observan las células que incorporaron yoduro de propidio (cuadrante superior izquierdo); las células con positividad para yoduro de propidio además de BCECF o Fluo3-AM (cuadrante superior derecho); las células no teñidas (cuadrante inferior izquierdo); y las células consideradas viables con positividad para BCECF o Fluo3-AM (cuadrante inferior derecho). Este último es nuestro cuadrante de interés para observar la fluorescencia para los dos parámetros a medir.

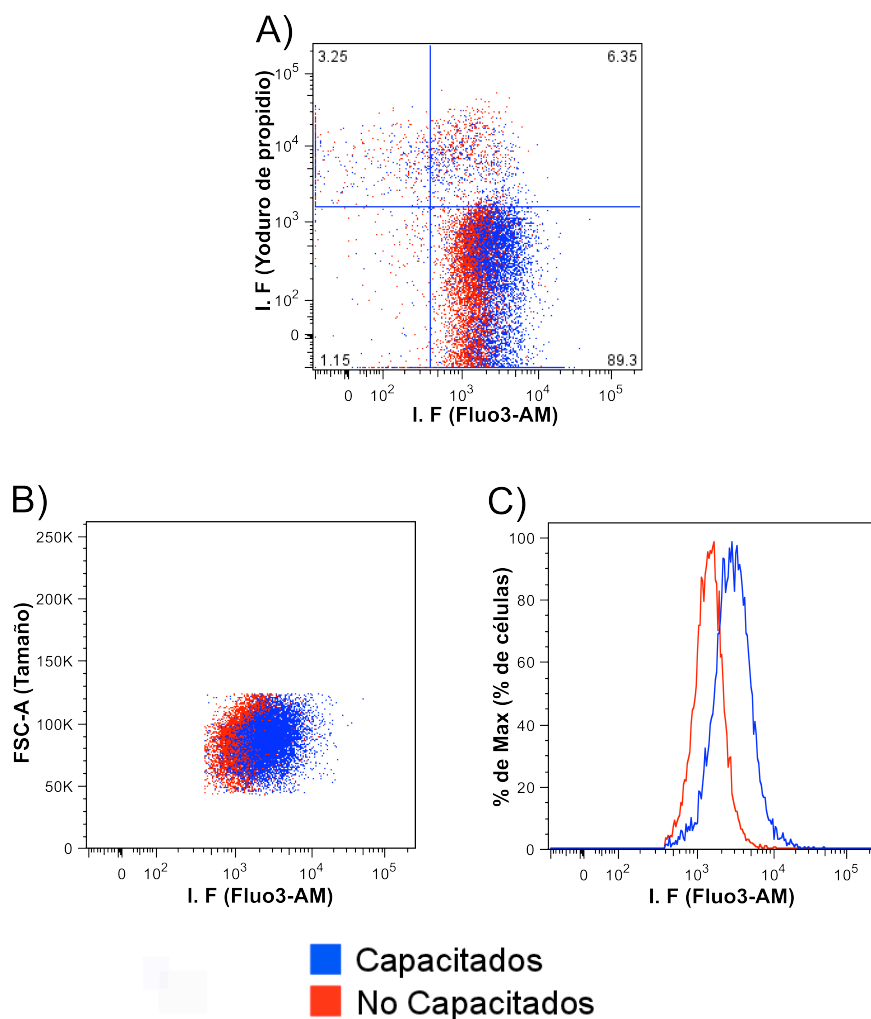
Para las figuras 11 y 12, los paneles A, B y C muestran dos poblaciones, no capacitadas (color rojo) y capacitadas (color azul). En el panel B, se aprecia la I. F de nuestro colorante sensible al pH (BCECF) o sensible al calcio (Fluo3-AM) contra el tamaño de las células (FSC-A) y para el panel C, la I. F para cada uno de los colorantes contra el porcentaje normalizado de células de cada muestra o porcentaje de máximo (% de Max).

Tanto el  $pH_i$  y la  $[Ca^{2+}]_i$  aumentan durante la capacitación, ya que se observa un desplazamiento de al menos una subpoblación capacitada de color azul hacia la derecha (indicando una mayor fluorescencia) en contraste con la población no capacitada en color rojo. Resultados que confirman que estos dos parámetros aumentan durante el proceso de capacitación [37].



**Figura 11: Espermatozoides capacitados presentan un aumento en el  $pH_i$ .**

Experimento representativo de mediciones de  $pH_i$  en espermatozoides no capacitados y capacitados por citometría de flujo. (A) Gráfica de puntos para la intensidad de fluorescencia para el colorante sensible al pH (I. F (BCECF)) contra yoduro de propidio (I. F (Yoduro de propidio)), se muestra cuatro cuadrantes: superior izquierdo (células muertas), superior derecho (células muertas positivas para BCECF), inferior izquierdo (células sin teñir) y el inferior derecho (células vivas positivas para BCECF), también se muestran los porcentajes de células correspondientes a cada cuadrante. (B) Gráfica de puntos para la I. F (BCECF) contra el tamaño de las células (FSC-A). (C) Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la I. F (BCECF). Los paneles B y C, representan las células viables donde las células capacitadas (azules) muestran un desplazamiento a la derecha con respecto a la población no capacitadas (rojas), indicando un incremento en el  $pH_i$ .



**Figura 12: El calcio del espermatozoide de humano aumenta durante la capacitación.**

Experimento representativo de mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides no capacitados y capacitados por citometría de flujo. (A) Gráfica de puntos para la intensidad de fluorescencia para el colorante sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  (I. F (Fluo3-AM)) contra yoduro de propidio (I. F (Yoduro de propidio)), se muestra cuatro cuadrantes: superior izquierdo (células muertas), superior derecho (células muertas positivas para Fluo3-AM), inferior izquierdo (células sin teñir) y el inferior derecho (células vivas positivas para Fluo3-AM), también se muestran los porcentajes de células correspondientes a cada cuadrante. (B) Gráfica de puntos para la I. F (Fluo3-AM) contra el tamaño de las células (FSC-A). (C) Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la I. F (Fluo3-AM). Los paneles B y C, representan las células viables donde las células capacitadas (azules) muestran un desplazamiento a la derecha con respecto a la población no capacitadas (rojas), indicando un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Se determinó el valor promedio de la intensidad media de fluorescencia (I. M. F) para cada medición, donde observamos que los valores de I. M. F para capacitados son mayores a diferencia de los no capacitados en ambas mediciones de pH y calcio (Tabla 2). Sin embargo estos datos no nos dan información sobre la existencia de diferentes subpoblaciones en cada muestra.

**Tabla 2: Espermatozoides capacitados tienen un aumento en la intensidad media de fluorescencia para BCECF y para Fluo3-AM.**

Espermatozoides	BCECF (pH)		Fluo3-AM (Calcio)	
	No Capacitados	Capacitados	No Capacitados	Capacitados
<b>I. M. F</b>	5446	8505	5603	9348
<b>Desviación estandar</b>	2648	4550	2809	3965
<b>Significancia</b>	N. S (P>0.05)		*(P<=0.05)	

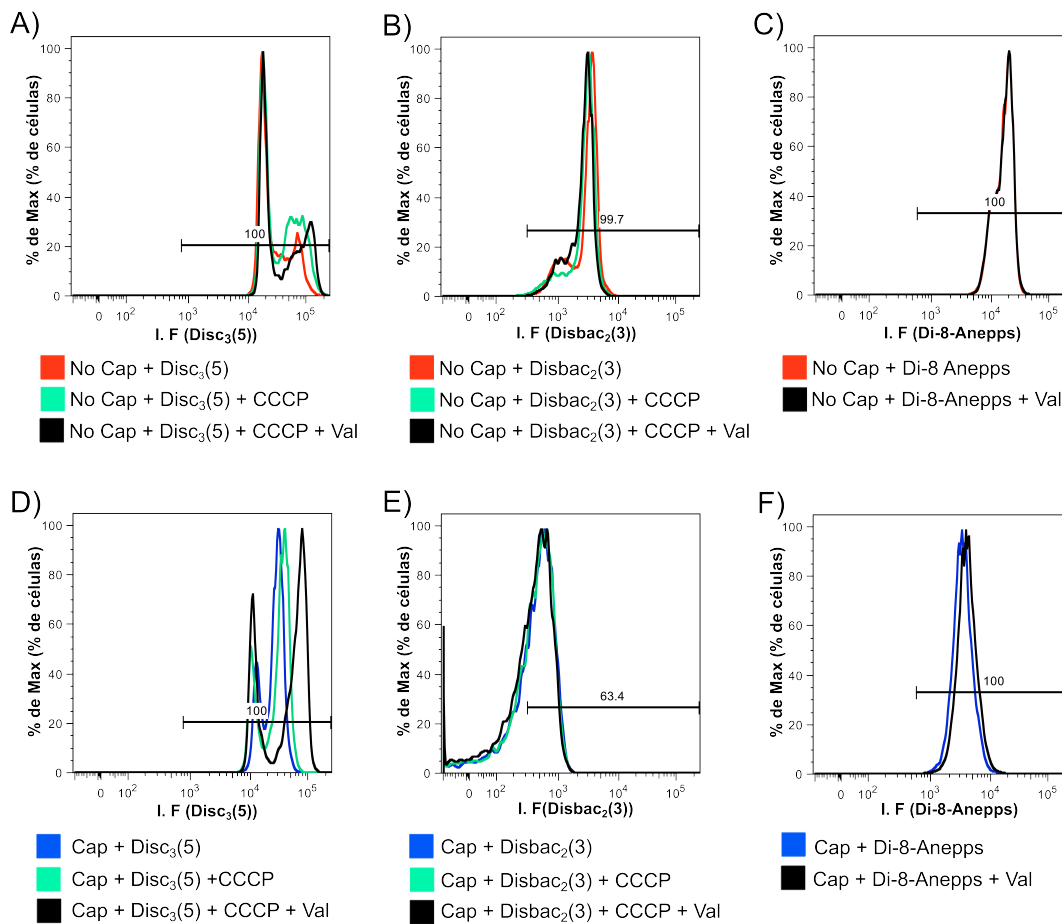
I. M. F, Intensidad media de fluorescencia. BCECF, indicador fluorescente sensible a pH. Fluo3-AM, indicador fluorescente sensible a calcio. N. S, no significativa.

### ***Medidas de potencial de membrana en citometría de flujo***

Con relación a la determinación del potencial de membrana de espermatozoides no capacitados y capacitados, los resultados obtenidos por espectrofluorometría convencional confirman lo que se había reportado con anterioridad, en el sentido de que no se detecta una hiperpolarización en espermatozoides capacitados. Por lo que se exploró la medición de potencial de membrana mediante citometría de flujo ya que proporciona información individual de una población grande de células, considerando que solo una subpoblación se capacita y si el cambio es pequeño, quizá se enmascare en los estudios previos.

Estudiamos diferentes indicadores sensibles al cambio en el potencial de membrana, DiSC<sub>3</sub>(5), DiSBAC<sub>2</sub>(3) y Di-8-Anepps. Determinamos cuál colorante es capaz de reportar cambios en el potencial de membrana en espermatozoides de humano, realizando adiciones con valinomicina en presencia o ausencia del desacoplante CCCP. La adición de Val fue control positivo para la hiperpolarización (figura 13).





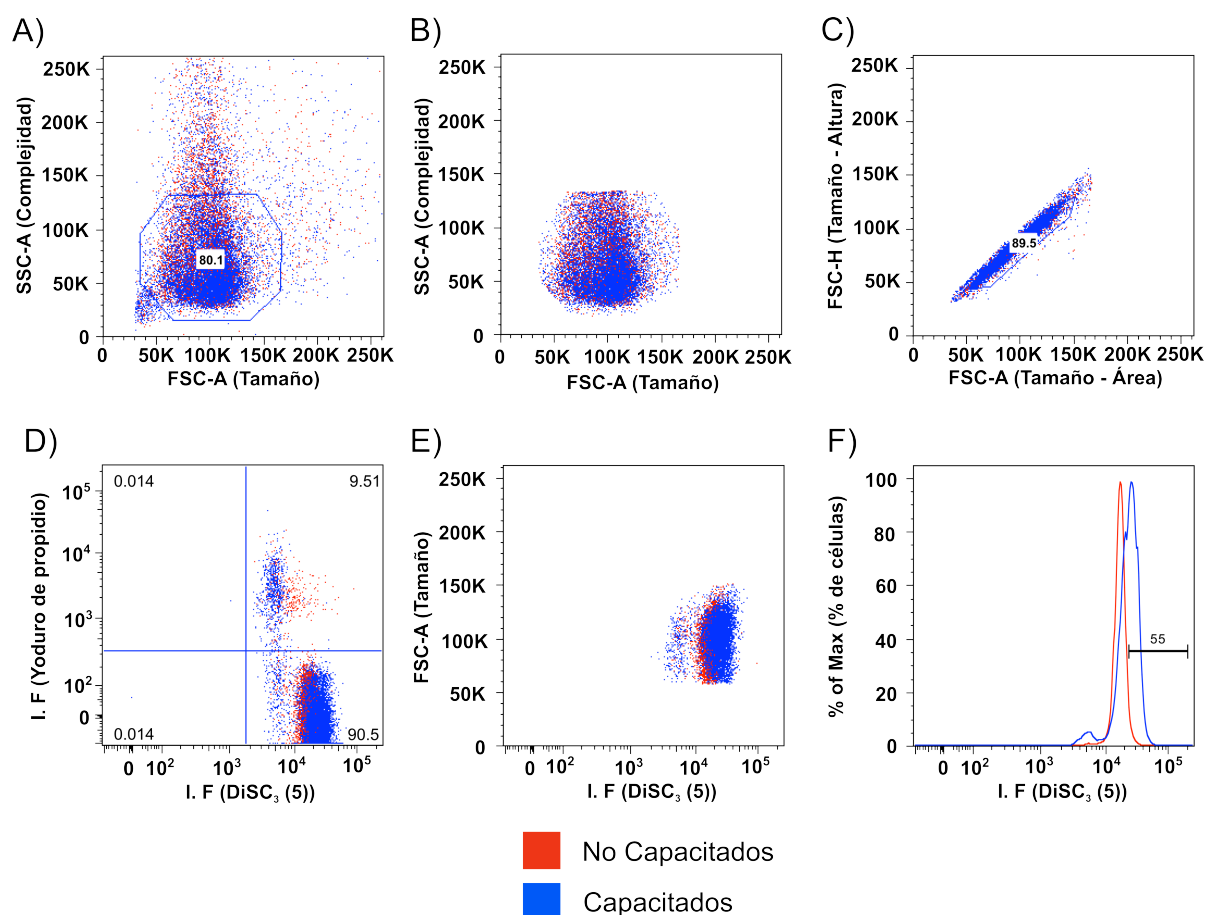
**Figura 13: Medición del potencial de membrana plasmática mediante citometría de flujo utilizando tres indicadores fluorescentes.**

Experimento representativo con histogramas de fluorescencia para determinar cambios en el potencial de membrana utilizando diferentes controles, en espermatozoides no capacitados (A, B y C) y capacitados (D, E y F). Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra intensidad de fluorescencia (I. F) para cada indicador fluorescente. Condición con DiSC<sub>3</sub>(5) (50 nM), CCCP (desacoplante mitocondrial) (0.5  $\mu$ M) y valinomicina (1  $\mu$ M) (para hiperpolarizar) (A, D). Tratamiento con DiSBAC<sub>2</sub>(3) (50 nM), con CCCP (0.5  $\mu$ M) y valinomicina (1  $\mu$ M) (B, E). Y cargados con Di-8-Anepps (50 nM) con valinomicina (1  $\mu$ M) (C, F). Indicando que las adiciones de valinomicina (trazo negro) muestran una hiperpolarización (incremento de fluorescencia) únicamente cuando los espermatozoides fueron cargados con DiSC<sub>3</sub>(5), demostrando que es el colorante adecuado para medir potencial de membrana.

Determinamos que el colorante DiSC<sub>3</sub>(5) es el más adecuado para las mediciones de potencial de membrana mediante citometría de flujo, debido a que muestra desplazamientos de fluorescencia en cada adición, siendo la adición de valinomicina la de mayor fluorescencia (trazo negro) indicando una hiperpolarización, esto explica por qué ha sido el colorante por excelencia en las medidas poblaciones reportadas a la fecha en espermatozoides de varias especies. Mientras DiSBAC<sub>2</sub>(3) y Di-8-Anepps no muestran desplazamientos entre los histogramas con las adiciones de valinomicina (figura 13). Por estos resultados, decidimos realizar las siguientes determinaciones con DiSC<sub>3</sub>(5) para contestar nuestra pregunta central sobre la existencia de la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación en espermatozoides de humano (figura 14).

Durante la realización de este trabajo tanto nuestro grupo como otros laboratorios en el mundo reconocieron que la adición de CCCP podría ejercer efecto también sobre la membrana plasmática. Adicionalmente, se conoce que el DiSC<sub>3</sub> (5) tiene una cola corta de alquilo (3 átomos de carbono), que lo hace poco hidrófobo y no favorece su incorporación en la mitocondria [50]. Por último, existen antecedentes de otros grupos que para la determinación del potencial de membrana plasmática no requieren de adición de CCCP [39]. Todo lo anterior nos llevó a decidir no utilizar el CCCP en los siguientes experimentos.

De una población heterogénea de espermatozoide en cuanto tamaño y complejidad, se seleccionaron *gates* o ventanas del área más densa (figura 14, panel A y B). Se excluyeron agregados mediante el uso de gráficas de tamaño - área y tamaño - altura (FSC-A vs FSC-H), como se determinó en la metodología (figura 14, panel C) y se descartaron las células muertas mediante el uso de gráficas de (I. F (DiSC<sub>3</sub>(5))) vs (I. F (Yoduro de propidio)), también descrito en metodología (figura 14, panel D). Finalmente, pudimos evaluar mediante histogramas de I. F del cambio en el potencial de células individuales y vivas. Donde observamos que en la mayoría de las muestras hay un aumento de la intensidad de fluorescencia en espermatozoides capacitados (azules) con respecto a los no capacitados (rojo) (figura 14, panel E y F), sugiriendo que durante la capacitación ocurre una hiperpolarización de la membrana plasmática.



**Figura 14: Ocurre una hiperpolarización durante la capacitación en espermatozoides de humano no agregados y vivos.**

Análisis de un experimento representativo para la determinación de los cambios en el potencial de membrana en espermatozoides no capacitados (rojo) y capacitados (azul). Gráfica de puntos para tamaño (FSC) contra complejidad celular (SSC) para toda la población (A). Región de interés que corresponde a la más densa (B). Gráfica de tamaño - área (FSC - A) contra tamaño - altura (FSC - H), el área seleccionada por un polígono corresponde a la región que excluye agregados celulares (C). Gráfica de puntos para la intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio (I. F (yoduro de propidio)) contra la intensidad de DiSC<sub>3</sub> (5) (I. F (DiSC<sub>3</sub> (5))), muestra cuatro cuadrantes: superior izquierdo (células muertas), superior derecho (células muertas positivas para DiSC<sub>3</sub> (5)), inferior izquierdo (células sin teñir) y el inferior derecho (Región de interés, células vivas positivas para DiSC<sub>3</sub> (5)), también se muestran los porcentajes de células correspondientes a cada cuadrante (D).

Gráfica de puntos para FSC contra I. F (DiSC<sub>3</sub> (5)) para células vivas (E). Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra I. F (DiSC<sub>3</sub> (5)) para células vivas (F). Los paneles D y E indican un incremento en la fluorescencia para la población capacitada (azul), revelando una hiperpolarización.

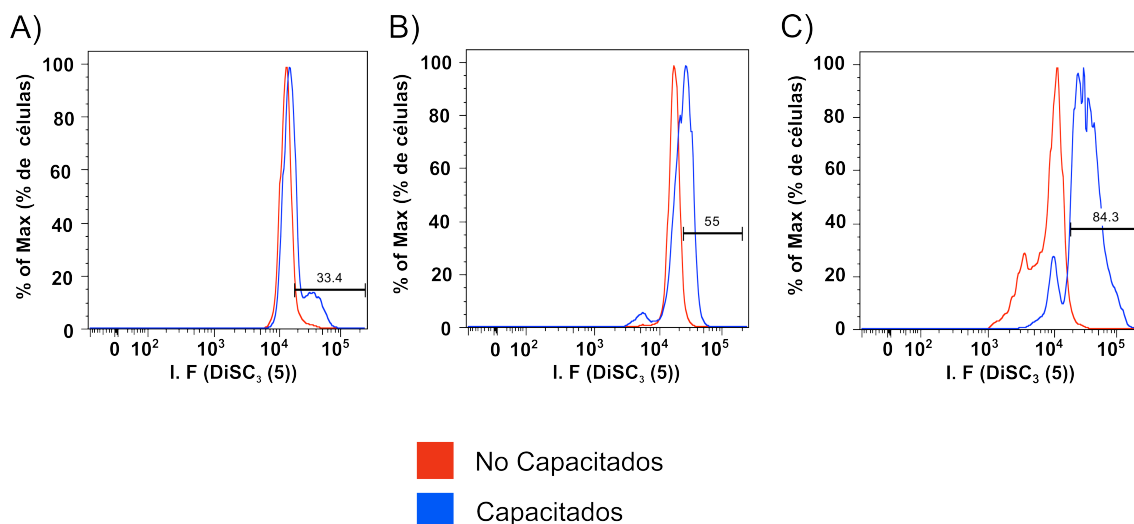
Además se observó que los valores de I. M. F para capacitados son mayores que los no capacitados en ambas mediciones de potencial de membrana (Tabla 3). Aunque estos datos no revelan que esta ocurriendo con el potencial de membrana de las subpoblaciones en condiciones capacitantes, claramente indican que la capacitación induce una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide humano.

**Tabla 3: Espermatozoides capacitados tienen un aumento en la intensidad media de fluorescencia para DiSC<sub>3</sub>(5)**

Espermatozoides	DiSC <sub>3</sub> (5) (Potencial de membrana)	
	No Capacitados	Capacitados
<b>I. M. F</b>	11489	21167
<b>Desviación estándar</b>	3675	5418
<b>Significancia</b>	**(P<=0.01)	

I. M. F, intensidad media de fluorescencia. DiSC<sub>3</sub>(5), indicador fluorescente sensible a cambios en el potencial de membrana

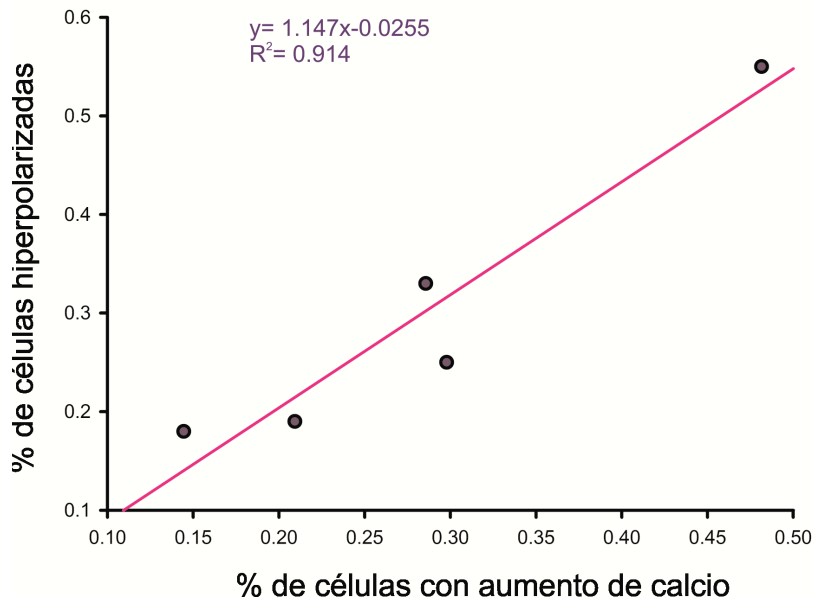
Para demostrar la validez del método, se analizaron 18 muestras provenientes cada uno de un donador diferente, de los cuales en sólo 16 experimentos se encontró una hiperpolarización. Se muestra el análisis de seis experimentos representativos utilizando espermatozoides de donadores diferentes, de los cuales todos presentaron una hiperpolarización de la membrana plasmática después de la capacitación (Figura 15). Los porcentajes promedio de células hiperpolarizadas es alrededor de un 52%. En algunos de estos experimentos encontramos la presencia de subpoblaciones con diferentes potenciales de membrana plasmática, demostrando que existen poblaciones no capacitadas y capacitadas.



**Figura 15: La capacitación produce una hiperpolarización que varía de acuerdo al donador.**

Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la intensidad de fluorescencia para DiSC<sub>3</sub>(5) (I. F (DiSC<sub>3</sub>(5))) para espermatozoides no capacitados (rojo) y capacitados (azul), en donde se muestran 3 experimentos representativos de donadores independientes que ilustran la variabilidad en el porcentaje de células hiperpolarizadas. Cada panel muestra el porcentaje de células hiperpolarizadas (porcentaje (33.4, 55, 84.3) arriba de la línea negra).

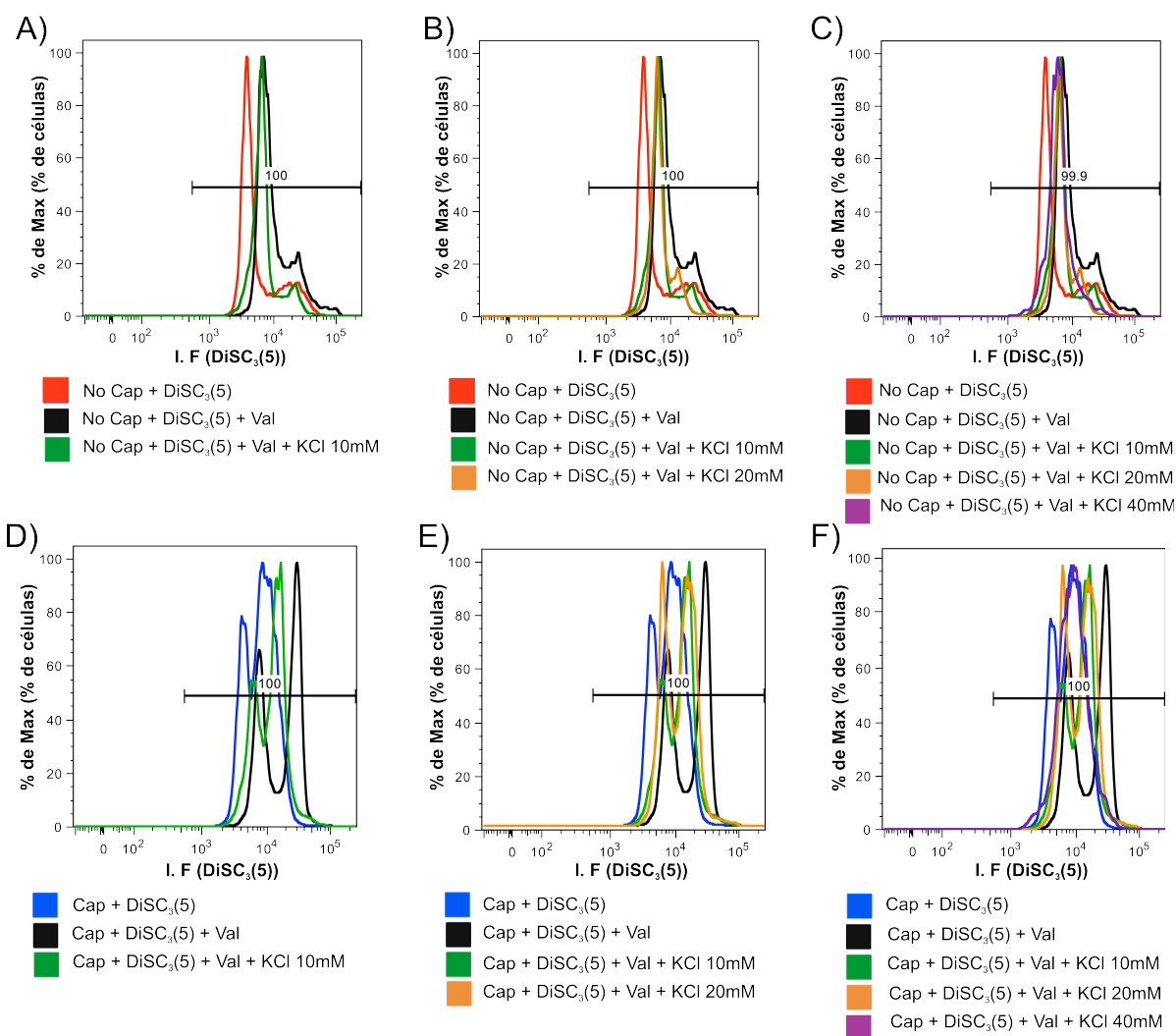
Dado que se ha reportado que durante la capacitación hay un aumento en el calcio intracelular, nos dimos a la tarea de averiguar si existe una correlación entre el número de células que presentaban aumento en ambos parámetros (calcio y potencial de membrana). Realizamos esta comparación usando 5 experimentos en donde medimos ambos parámetros graficando el % de células hiperpolarizadas vs el % de células que aumentaron su Ca<sup>2+</sup>. El porcentaje de células hiperpolarizadas presentó una estrecha correlación con el porcentaje de células con alto calcio. El grafico muestra que la relación es de tipo lineal, dentro del rango de los datos. El coeficiente de determinación, R<sup>2</sup> es una medida de bondad de ajuste de los modelos de regresión lineal a los datos graficados y este coeficiente es de R<sup>2</sup> = 0.914 lo que indica que es un buen ajuste para afirmar la relación entre estas dos condiciones (figura 16).



**Figura 16: Existe una correlación entre el porcentaje de células hiperpolarizadas y el porcentaje de células con aumento de calcio.**

Representación de los datos en un gráfico de dispersión, donde se muestra la regresión lineal y se muestra el coeficiente de determinación,  $R^2$ , como el cuadrado del coeficiente de correlación entre los valores del % de células hiperpolarizadas y el % de células con aumento de calcio.

Aunque las medidas de potencial de membrana por citometría de flujo no son cuantitativas, a manera de calibración cualitativa, hiperpolarizamos a los espermatozoides con valinomicina ( $2 \mu\text{M}$ ) y agregamos diferentes concentraciones de KCl (10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM y 70 mM) control positivo para depolarización. Los gráficos de la figura 17 muestran que la adición de valinomicina hiperpolariza al máximo, trazo en negro mostrado a la derecha y vemos que la adición de KCl a diferentes concentraciones, depolariza gradualmente (verde, naranja y rosa fuerte), desplazando los histogramas a la izquierda a medida que se incrementa la concentración de KCl, estos resultados fueron reproducibles en todos los experimentos realizados para ambas condiciones (no capacitados y capacitados), lo que confirma que mediante esta técnica es posible detectar cambios en el potencial de membrana inducidos por valinomicina y KCl.



**Figura 17: Efecto de la valinomicina y diferentes concentraciones de KCl sobre el potencial de membrana plasmática en espermatozoides.**

Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la intensidad de fluorescencia de DiSC<sub>3</sub>(5) (I. F (DiSC<sub>3</sub>(5))) en espermatozoides no capacitados (A, B y C) y capacitados (D, E y F) en presencia de controles de hiperpolarización (valinomicina (2 μM)) y depolarización (KCl (10 mM, 20 mM y 40 mM)). El código de color del trazo corresponde a la condición descrita en la parte inferior. Se observa que la adición de valinomicina causa un desplazamiento hacia la derecha, indicando una hiperpolarización al máximo y posteriormente vemos que al adicionar KCl el histograma se desplaza a la izquierda conforme va incrementando la concentración, indicando una depolarización, confirmando que el colorante es capaz de detectar cambios en el potencial de membrana.

## ***Separación de poblaciones mediante citometría de flujo***

El desarrollo de la técnica de selección y separación de espermatozoides mediante citometría de flujo tiene muchos beneficios debido a que se podrían seleccionar espermatozoides aptos para fecundar al óvulo y de esta manera se podría estudiar a fondo el proceso de fecundación.

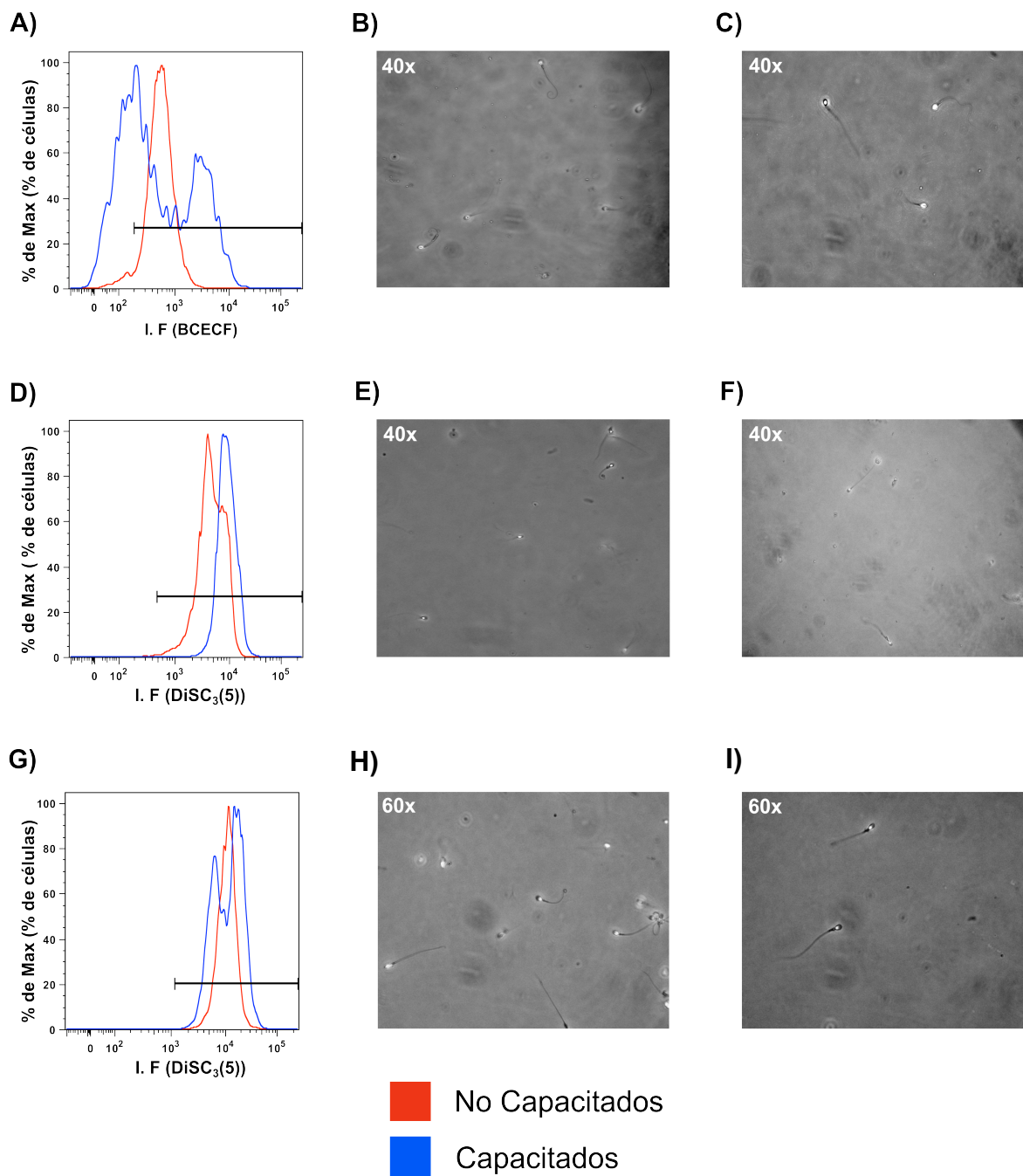
En los primeros experimentos tuvimos dificultad para obtener células íntegras en cuanto a morfología y movilidad, ya que se observaron restos celulares al parecer de fragmentos de flagelo, posiblemente debido a la alta presurización del procedimiento por el que se colectaron las células.

Se ajustaron algunos parámetros hasta encontrar las condiciones óptimas para lograr una mayor viabilidad e integridad celular. Se hicieron 6 experimentos, de los cuales se separaron poblaciones de acuerdo a diferentes criterios: incremento de calcio intracelular (Fluo3-AM), incremento del pH (BCECF) y por la hiperpolarización (DiSC<sub>3</sub>(5)).

A pesar de estar muy diluida la muestra, se logró apreciar al menos dos espermatozoides por campo, sin necesidad de centrifugación. Se tomaron micrografías y videos de los espermatozoides antes y después de la separación, para verificar que los espermatozoides sean motiles y viables en la población separada, comparándolos con los que no se separaron.

En la figura 18 se muestran 3 experimentos representativos de espermatozoides capacitados separados por pH (panel A) y por hiperpolarización (paneles D y G). También se muestran micrografías de espermatozoides antes de separarse (paneles B, E y H) y después de separar las células capacitadas que tuvieron un aumento de pH (panel C) y que presentaron una hiperpolarización (paneles F e I). Indicando que se pueden separar poblaciones de acuerdo con estos parámetros.





**Figura 18: Espermatozoides viables y motiles después de separarse mediante FACS.**

Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la intensidad de fluorescencia para BCECF (I. F. (BCECF)) de espermatozoides no capacitados (trazo rojo) y capacitados (trazo azul) (A). Histograma del porcentaje normalizado de células o porcentaje del máximo (% de Max) contra la intensidad de fluorescencia para DiSC<sub>3</sub>(5) (I. F. (DiSC<sub>3</sub>(5))) (D y G). Micrografías de espermatozoides capacitados antes de separar (B, E y H) y después de separar la población capacitada que presento un aumento de pH

(C) y una hiperpolarización con respecto a la población no capacitada (F e I). Indicando que no hay diferencias entre la población no capacitada y capacitada, por lo que podemos concluir que es una excelente técnica para obtener poblaciones capacitadas con alta pureza.

## Discusión

El objetivo principal de este proyecto de tesis fue determinar si ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana durante capacitación en espermatozoides humanos. Se sabe que existe una hiperpolarización durante la capacitación en espermatozoides en algunos modelos, como murinos, lepóridos, bovinos, y equinos [24–27] y que este proceso es fundamental para la fecundación.

Para abordar este proyecto se utilizaron diferentes tiempos y condiciones de no capacitación y capacitación, ya que se discute en diferentes laboratorios cual es el tiempo necesario para capacitar, ya que este tiempo puede variar de 2 hasta 24 horas.

Las medidas de potencial de membrana en todas las condiciones probadas mediante el espectrofluórometro convencional, respaldan los datos ya publicados donde no encuentran una hiperpolarización de la membrana durante la capacitación [51]. Nuestros datos utilizando la misma técnica muestran que no hay diferencias significativas entre espermatozoides no capacitados y capacitados registrándolos a diferentes tiempos de capacitación, oscilando en un potencial de reposo de -63 a -69 mV en condiciones no capacitantes y de -59 a -64mV en condiciones capacitantes. Existen reportes independientes donde muestran el valor del  $E_{m_{rep}}$  en ambas condiciones, es decir un artículo determina un valor de -40mV para espermatozoides no capacitados [39] y otro artículo determina un valor de -58mV para capacitados [40]. Sin embargo, estas medidas se realizaron en condiciones diferentes y no se puede concluir de estos datos que existe una hiperpolarización. Hasta donde nosotros conocemos, existe un solo reporte donde miden el potencial de membrana en ambas condiciones por citometría de flujo, sin embargo ese trabajo no tiene los controles, no realizaron estadística y no mencionan el número de experimentos realizados. A falta de reportes sólidos, nos dimos a la tarea de explorar el potencial de membrana. Los resultados obtenidos con espectrometría convencional no nos permitieron detectar un cambio de

potencial de membrana durante la capacitación. Por lo tanto, decidimos emplear citometría de flujo, ya que es una técnica que tiene muchas ventajas, en especial el hecho de poder evaluar simultáneamente miles de células en segundos y obtener información individual de las células, permitiendo la medición simultánea de múltiples parámetros, lo que la hace una herramienta con alta sensibilidad y objetividad, que podría permitirnos identificar una subpoblación hiperpolarizada.

A pesar de no existir experiencia previa en el análisis de espermatozoides por citometría de flujo, se logró establecer la correcta discriminación de éstas, mediante la amplificación logarítmica de la señal (modo log). Se realizaron análisis meticulosos para seleccionar las células individuales y excluir a las muertas para cada análisis, utilizando la contratinción con yoduro de propidio. En este proyecto se resaltó la importancia de hacer un análisis adecuado ya que muchas veces no se filtra la información sobre las células de interés.

Se hizo una curva de titulación para cada colorante utilizado en esta metodología. La curva de titulación de colorantes confirmó la sensibilidad del equipo, lo que nos permite utilizar una menor concentración del colorante.

Con el fin de validar que el citómetro de flujo es capaz de distinguir el cambio en la fluorescencia de las células, identificando células capacitadas de no capacitadas, se midieron las concentraciones de calcio y pH intracelular, resultando en una mayor fluorescencia en capacitados a diferencia de los no capacitados, datos congruentes con lo ya reportado, ya que se sabe que aumentan durante el proceso de capacitación [37], confirmando que el sistema experimental es funcional y suficientemente sensible para identificar células capacitadas.

Nuestro análisis mostró que utilizando cualquier indicador fluorescente sensible a potencial de membrana es posible detectar una hiperpolarización en espermatozoides capacitados, sin embargo al hacer calibraciones cualitativas observamos que DiSC<sub>3</sub>(5) es el mejor indicador para medir potencial de membrana. Hallamos 16 experimentos los cuales presentaron una hiperpolarización, con un

porcentaje promedio de células hiperpolarizadas, alrededor de 52%. También podemos afirmar que la medición en el potencial de membrana plasmática de espermatozoides no capacitados y capacitados en citometría de flujo, permite una clara identificación de varias poblaciones espermáticas con diferentes valores de potencial hiperpolarizadas. Esto puede explicar los resultados obtenidos mediante espectrofluorimetría, ya que podría existir una población depolarizada y otra hiperpolarizada y en el análisis de espectrofluorimetría convencional donde se promedia la intensidad de fluorescencia para todas las poblaciones, se podría enmascarar el resultado de potencial de membrana. A su vez podemos sugerir que se tratan de poblaciones que están pasando por un diferente estadio de capacitación.

En este proyecto se cuantificó el porcentaje de células hiperpolarizadas y se ve una estrecha correlación al porcentaje de células con alto calcio, ya que el coeficiente de determinación es de  $R^2=0.914$  entre estos dos parámetros, lo que nos hace pensar que las células que muestran una hiperpolarización están capacitadas.

La señal de fluorescencia generada por DiSC<sub>3</sub>(5), un colorante catiónico, carbocianina refleja los potenciales de la membrana plasmática y de otros compartimentos, tales como las mitocondrias. Sin embargo, DiSC<sub>3</sub>(5) tiene una cola corta de alquilo (3 átomos de carbono), que lo hace poco hidrófobo y no favorece su incorporación en la mitocondria [50]. Pero es indispensable calibrar con el uso de valinomicina y diferentes concentraciones de KCl para garantizar la depolarización e hiperpolarización de los espermatozoides, lo que nos mostró que los cambios eran dinámicos y acordes a los deseados. En condiciones normales, el ionóforo de K<sup>+</sup> causó un aumento en la fluorescencia coherente con una hiperpolarización y las adiciones de K<sup>+</sup> mostraron una reducción en la fluorescencia a valores estables indicando despolarización. Se incluyó un control solo con DiSC<sub>3</sub>(5), para confirmar que la muestra estaba en un potencial de membrana en reposo similar antes de cada tratamiento.

El desarrollo de la técnica de selección y separación de espermatozoides mediante citometría de flujo en función del potencial de membrana podría ser uno de los

avances más importantes dentro de la tecnología de la reproducción, debido a que de esta manera se podrían seleccionar a los espermatozoides más aptos y preparados para fecundar el óvulo. Se podría emplear en el ganado para promover el aumento en la eficiencia de la producción, ya que hasta la fecha se han tomado otros parámetros para la selección de espermatozoides para su posterior inseminación quirúrgica, FIV o bien para fines de investigación. Los resultados obtenidos demuestran que es posible separar subpoblaciones de espermatozoide de humano que presenten hiperpolarización, que estén íntegros en su estructura y sean viables para su posterior uso.

La separación de espermatozoides mediante citometría de flujo permitió la obtención de rendimientos altos en la integridad y viabilidad de los espermatozoides, haciendo esta tecnología muy atractiva para nuestro equipo de trabajo.

La relevancia fisiológica de esta hiperpolarización no se demuestra en este proyecto y se mantiene bajo especulación. Sin embargo, el conocimiento generado a partir de estas determinaciones es de suma importancia para contribuir en el entendimiento de vías de señalización y se podría encontrar, en un futuro, posibles blancos para próximos anticonceptivos, si se determinara que esta hiperpolarización se debe al canal de  $K^+$  Slo3, de expresión específica en espermatozoides. Se sabe que sólo la remoción de los canales Slo3 en el espermatozoide del ratón es suficiente para que éstos no desarrollen una hiperpolarización [34], por lo que se piensa que el canal Slo3 es indispensable para la fecundación. Dado que el Slo3 se expresa en espermatozoide de humano, sería interesante bloquear los canales Slo3 usando inhibidores como tetraetilamonio (TEA) [52] y clofilium para corroborar su participación durante la hiperpolarización de membrana.

## Conclusiones

Con las mediciones del potencial de membrana plasmática por el método de fluorimetría convencional no se pudo detectar una hiperpolarización asociada con la capacitación, independientemente del tiempo de capacitación (5 o 13 horas).

Las mediciones de potencial de membrana plasmática mediante citometría de flujo nos permitieron detectar un cambio en el mismo, correspondiendo a una hiperpolarización del potencial de membrana plasmática durante la capacitación, usando DiSC<sub>3</sub> (5), DiSBAC<sub>2</sub>(3) y Di-8-anepps. Sin embargo hay una variabilidad en las muestras.

Se estableció que el mejor indicador para determinar el potencial de membrana es DiSC<sub>3</sub>(5) para las medidas de citometría de flujo.

En algunos casos solo se hiperpolariza una subpoblación, lo que podría explicar por qué en mediciones en población de espermatozoides, no se detectó un cambio significativo en el potencial de membrana.

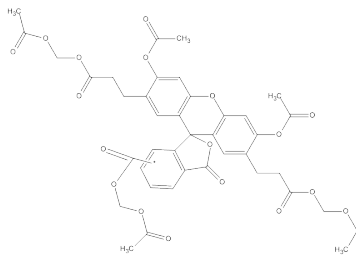
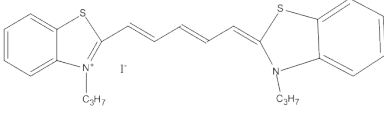
Otros parámetros ( $\text{Ca}^{2+}$  y pH) que cambian durante el proceso de capacitación, se midieron y se comprobó su cambio mediante citometría de flujo.

Existe una correlación entre el porcentaje de células hiperpolarizadas y el porcentaje de células con alto calcio.

Se logró ajustar los parámetros de presurización para realizar la separación de células mediante el citómetro de flujo FACSAria II, permitiendo la recuperación de un mayor porcentaje de células viables y motiles.

## Anexos

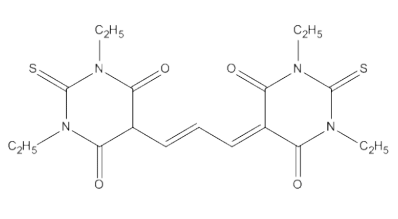
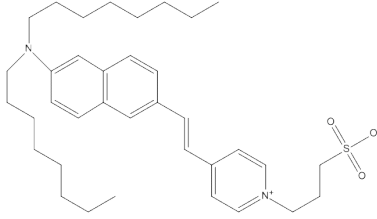
**Tabla (Anexos) 1: Descripción de los indicadores fluorescentes BCECF y DiSC<sub>3</sub>(5)**

Nombre Comercial	BCECF-AM	DiSC <sub>3</sub> (5)
Nombre científico	2',7'-bis-(2-Carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester	Benzotiazolium, 3-propil-2-[5-(3-propil-2(3H)-benzotiazolilideno)-1,3-pentadien-1-yl]-, iodide (1:1)
Químico/clase de colorante	Xantana	Cianina
Estructura		
Formula molecular	C <sub>35</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> IN <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
Peso Molecular	688.59	546.53
Forma Física	Cristales naranja a café	Polvo verde oscuro
Solubilidad	Soluble en dimetil sulfoxido	Soluble en metanol, N,N-dimetylformamida, dimetil sulfoxido
Absorción (λ <sub>max</sub> )	503 nm	651 nm
Emisión (λ <sub>max</sub> )	520 nm	675 nm
Aplicaciones de tinción	Medición de pH en células de mamífero, tejidos, espacio intracelular, células de plantas, bacteria, levadura, etc.	Bacterias, células, citocromo c oxidasa, hongos, espermatozoides, células epiteliales, partículas lipídicas, liposoma, linfocitos, lisosomas, microorganismos, células de neuroblastoma, neutrófilos, eritrocitos, células tumorales, entre otros
Aplicaciones Biológicas	Indicador de pH intracelular	Medición del potencial de membrana, medición de fusión de membranas, detección de cáncer de próstata, hibridación de ácidos nucleicos, inmunoensayos, agentes anticáncer
Características	El grupo acetoximetil ester (AM) no es fluorescente en solución. Está permite que el colorante sea permeable a la membrana plasmática. En el citoplasma éste grupo es cortado por las esterasas y esto impide la salida del colorante. El colorante es dependiente de cambios en el pH <sub>i</sub> .	Catiónico, se incorpora a las membranas o biomoléculas como las proteínas lipofílicas, alto coeficiente de extinción de la fluorescencia dependiente de la polaridad y de corta vida en estado excitado.

\*Tabla modificada de: [53]

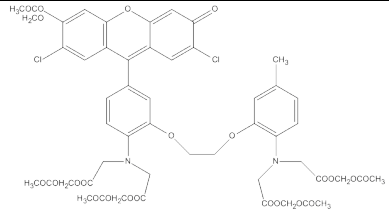
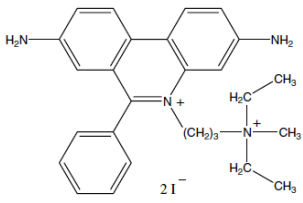


**Tabla (Anexos) 2: Descripción de los indicadores fluorescentes DiSBAC<sub>2</sub>(3) y Di-8-ANEPPS**

Nombre Comercial	DiSBAC <sub>2</sub> (3)	Di-8-ANEPPS
Nombre científico	4,6(1H,5H)-Pyrimidinedione, 5-[3-(1,3-diethylhexahydro-4,6-dioxo-2-thioxo-5-pyrimidinyl) 2-propen-1-ylidene]-1,3-diethylidihydro-2-thioxo-	Pyridinium, 4-[2-[6-(dioctylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl)-, inner salt
Químico/clase de colorante	Oxonol	Derivado de estireno
Estructura		
Formula molecular	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
Peso Molecular	436.55	592.88
Forma Física	Polvo morado	Polvo naranja a rojo
Solubilidad	Soluble en etanol, metanol, dimetil sulfoxido	Soluble en etanol, metanol, dimetil sulfoxido
Absorción (λ <sub>max</sub> )	535 nm	498 nm
Emisión (λ <sub>max</sub> )	560 nm	713 nm
Aplicaciones de tinción	Células, sustrato de la toxina clostridial, células endoteliales, partículas lipídicas, miocardio, neuronas, islotes de Langerhans, células epiteliales, entre otros	Cardiomiocitos, superficie de membranas, partículas lipídicas, neuronas, prestinas, proteínas, óvulos de erizo de mar, entre otros
Aplicaciones Biológicas	Medición de potencial de membrana, ensayos de actividad de canales iónicos, detección de CFTR, modulación del canal HCN, apertura de canales BK	Medición del potencial de membrana, imágenes de exocitosis y fecundación
Características	Se une a proteínas lipofílicas y membrana plasmática. La eficiencia cuántica de DiSBAC <sub>2</sub> (3) aumenta cuando se desplaza el colorante de la solución acuosa en las membranas.	Se incorpora en la bicapa lipídica de la membrana plasmática.

\*Tabla modificada de: [53]

**Tabla (Anexos) 3: Descripción de los indicadores fluorescentes Fluo3-AM y Yoduro de propidio**

Nombre Comercial	Fluo3-AM	Yoduro de Propidio
Nombre científico	Glycine, N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-dichloro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis [2 [(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy] ethoxy]phenyl]-N-[2-(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]-, acetyloxy)methyl ester	Phenanthridinium, 3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl-, iodide (1:2)
Químico/clase de colorante	Xantana	Fenantridina
Estructura		
Formula molecular	$C_{51}H_{50}Cl_2N_2O_{23}$	$C_{27}H_{34}I_2N_4$
Peso Molecular	1129.85	668.39
Forma Física	Cristales rojo oscuro	Polvo Rojo
Solubilidad	Soluble en dimetil sulfoxido, metanol	Soluble en agua, N,N-dimetilformamida, dimetil sulfoxido
Absorción ( $\lambda_{max}$ )	464 nm	493, 535 nm
Emisión ( $\lambda_{max}$ )	525 nm	636, 617 nm
Aplicaciones de tinción	Iones Calcio, células, espermatozoides, neuronas	Ácidos nucleicos, células, células HeLa, Células cancerígenas, Células troncales, Levaduras, Leucocitos, Nódulos linfáticos, espermatozoides, proteínas, parásitos, microorganismos, etc.
Aplicaciones Biológicas	Indicador Calcio, Detecta células tumorales, identificación de modulación del sabor, dolor	Detecta ácidos nucleicos, células cancerígenas, esporas, actividad hidrolasa, microorganismos, ensayos de apoptosis, etc.
Características	El grupo acetoximetil ester (AM) no es fluorescente en solución. Este permite que el colorante sea permeable a la membrana plasmática. En el citoplasma este grupo es cortado por las esterasas y esto impide la salida del colorante. El colorante es dependiente de cambios en la concentración de Calcio.	Colorante que tiene gran afinidad a ácidos nucleicos tiñéndolos e indica la presencia de células muertas

\*Tabla modificada de: [53]

**Tabla (Anexos) 4: Descripción de indicadores fluorescentes sensibles a potencial de membrana, calcio y pH, correlacionando con su pareja de indicador de viabilidad**

<u>Colorante</u>	<u>Filtro</u>	<u>Ex (Å)</u>	<u>Em (Å)</u>	<u>Colorante</u>	<u>Filtro</u>	<u>Ex (Å)</u>	<u>Em (Å)</u>
<b>Potencial de membrana</b>				<b>Pareja con viabilidad</b>			
<b>Disc3(5)</b>	APC	651 nm	675 nm	SYBR-14	FITC	490 nm	516 nm
<b>DiSBAC2(3)</b>	PE	535 nm	560 nm	SYBR-14	FITC	490 nm	516 nm
<b>Di-8-ANEPPS</b>	PE-TXR	498 nm	635 nm	DIFICIL			
<b>Calcio</b>				<b>Pareja con viabilidad</b>			
<b>Fluo3-AM</b>	FITC	464 nm	525 nm	PI	PI	536 nm	620 nm
<b>pH</b>				<b>Pareja con viabilidad</b>			
<b>BCECF-AM</b>	FITC	503 nm	520 nm	PI	PI	536 nm	620 nm
<b>Viabilidad</b>				<b>Pareja con viabilidad</b>			
<b>SYBR-14</b>	FITC	490 nm	516 nm	PI	PI	536 nm	620 nm
<b>Calceina-am</b>	FITC	494 nm	517 nm	PI	PI	536 nm	620 nm
<b>PI</b>	PI	536 nm	620 nm	SYBR-14	FITC	490 nm	516 nm
<b>Homodimero de Etidio</b>	PI	528 nm	617 nm	SYBR-14	FITC	490 nm	516 nm

Muestra los colorantes fluorescentes para cada parámetro (Potencial de membrana, calcio y pH), el detector utilizado en el citómetro de flujo (el cual permite la detección de los fluorocromos utilizados (APC, FITC, PE, PE-TXR y PI), correspondiente a cada colorante y su pareja de viabilidad a evaluar

## **Bibliografía**

- [1] M. C. Chang, "The Meaning of Sperm Capacitation," *Journal of Andrology*, vol. 5, pp. 45–50, 1984.
- [2] P. M. Wassarman, L. Jovine, and E. S. Litscher, "A profile of fertilization in mammals," *Nature cell biology*, vol. 3, no. 2, pp. E59–64, Feb. 2001.
- [3] S. Pesch and M. Bergmann, "Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation.," *Micron*, vol. 37, no. 7, pp. 597–612, Jan. 2006.
- [4] M. H. Burgos and D. W. Fawcett, "Studies on the fine structure of the mammalian testis," *J Biophys Biochem Cytol*, vol. 1, no. 4, pp. 287–300, 1955.
- [5] K. Miki, W. Qu, E. H. Goulding, W. D. Willis, D. O. Bunch, L. F. Strader, S. D. Perreault, E. M. Eddy, and D. A. O. Brien, "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S a sperm-specific glycolytic enzyme , is required for sperm motility and male fertility," vol. 101, no. 47, pp. 16501–16506, 2004.
- [6] A. Darszon, C. Beltrán, R. Felix, T. Nishigaki, and C. L. Treviño, "Ion transport in sperm signaling," *Developmental biology*, vol. 240, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2001.
- [7] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Treviño, "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa," *Physiological reviews*, vol. 91, pp. 1305–1355, Oct. 2011.
- [8] S. S. Suarez, "Control of hyperactivation in sperm.," *Human reproduction update*, vol. 14, no. 6, pp. 647–657, 2008.
- [9] R. Yanagimachi, "The Movement of Golden Hamster Spermatozoa Before and After Capacitation," *J. Reprod. Fert*, vol. 23, pp. 193–196, 1970.
- [10] C. R. Stauss, T. J. Votta, and S. S. Suarez, "Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida," *Biology of reproduction*, vol. 53, pp. 1280–1285, Dec. 1995.
- [11] M. E. Teves, H. a Guidobaldi, D. R. Uñates, R. Sanchez, W. Miska, S. J. Publicover, A. a Morales Garcia, and L. C. Giojalas, "Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone.," *PloS one*, vol. 4, Jan. 2009.
- [12] F. M. Flesch and B. M. Gadella, "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1469, pp. 197–235, Nov. 2000.
- [13] B. K. Davis, R. Byrne, and K. Bedigian, "Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 77, no. 3, pp. 1546–1550, Mar. 1980.

- [14] R. Yanagimachi, "Mammalian fertilization," in *The Physiology of Reproduction*, Second., E. Knobil and J. Neill, Eds. New York: Raven Press, 1994, pp. 189–316.
- [15] P. E. Visconti, V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight, and A. B. Diekman, "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity.," *Journal of reproductive immunology*, vol. 53, no. 1, pp. 133–150, Jan. 2002.
- [16] F. Xie, M. a Garcia, A. E. Carlson, S. M. Schuh, D. F. Babcock, B. S. Jaiswal, J. a Gossen, G. Esposito, M. van Duin, and M. Conti, "Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization," *Developmental biology*, vol. 296, no. 2, pp. 353–62, Aug. 2006.
- [17] S. K. Hanks and T. Hunter, "The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase ( catalytic ) domain structure and classification," *The FASEB Journal*, vol. 9, pp. 578–596, 1995.
- [18] I. a Demarco, F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J. L. De La Vega-Beltran, J. W. Hockensmith, G. S. Kopf, A. Darszon, and P. E. Visconti, "Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 9, pp. 7001–9, Feb. 2003.
- [19] H. Chang and S. S. Suarez, "Two distinct Ca<sup>2+</sup> signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice," *Biology of reproduction*, vol. 85, pp. 296–305, Aug. 2011.
- [20] M. a Garcia and S. Meizel, "Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.," *Molecular reproduction and development*, vol. 52, pp. 189–195, Feb. 1999.
- [21] A. L. Woo, P. F. James, and J. B. Lingrel, "Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in sperm motility.," *Molecular reproduction and development*, vol. 62, pp. 348–356, Jul. 2002.
- [22] S. M. Bell, C. M. Schreiner, P. J. Schultheis, M. L. Miller, L. Richard, C. V Vorhees, G. E. Shull, W. J. Scott, S. M. Bell, C. M. Schreiner, P. J. Schultheis, M. L. Miller, R. L. Evans, C. V Vorhees, G. E. Shull, and W. J. Scott, "Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia , growth retardation , and seizures," *American journal of physiology*, pp. c788–c795, 1999.
- [23] D. Wang, S. M. King, T. a Quill, L. K. Doolittle, and D. L. Garbers, "A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility," *Nature cell biology*, vol. 5, no. 12, pp. 1117–11122, Dec. 2003.
- [24] J. Escoffier, D. Krapf, F. Navarrete, A. Darszon, and P. E. Visconti, "Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation.," *Journal of cell science*, vol. 125, no. Pt 2, pp. 473–485, Jan. 2012.
- [25] E. O. Hernandez, C. L. Treviño, L. E. Castellano, J. L. Vega-beltran, A. Y. Ocampo, E. Wertheimer, P. E. Visconti, and A. Darszon, "Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 33, pp. 24397–24406, Aug. 2007.

- [26] L. a McPartlin, P. E. Visconti, and S. J. Bedford-Guaus, "Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm," *Biology of reproduction*, vol. 85, pp. 179–188, Jul. 2011.
- [27] Y. Zeng, E. N. Clark, and H. M. Florman, "Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion," *Developmental biology*, vol. 171, pp. 554–563, 1995.
- [28] C. Arnoult, I. G. Kazam, P. E. Visconti, G. S. Kopf, M. Villaz, and H. M. Florman, "Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 12, pp. 6757–6762, Jun. 1999.
- [29] C. Muñoz-Garay, J. L. De la Vega-Beltrán, R. Delgado, P. Labarca, R. Felix, and A. Darszon, "Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation.," *Developmental biology*, vol. 234, pp. 261–274, Jun. 2001.
- [30] P. E. Visconti, D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltrán, J. J. Acevedo, and A. Darszon, "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation.," *Asian journal of andrology*, vol. 13, no. 3, pp. 395–405, May 2011.
- [31] D. L. Minor, "Potassium channels: life in the post-structural world," *Current opinion in structural biology*, vol. 11, pp. 408–414, Aug. 2001.
- [32] J. J. Acevedo, I. Mendoza-Lujambio, J. L. de la Vega-Beltrán, C. L. Treviño, R. Felix, and A. Darszon, "KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation.," *Developmental biology*, vol. 289, no. 2, pp. 395–405, Jan. 2006.
- [33] M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito, and L. Salkoff, "Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3509–3516, Feb. 1998.
- [34] C. M. Santi, P. Martínez-López, J. L. de la Vega-Beltrán, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, and L. Salkoff, "The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility.," *FEBS letters*, vol. 584, pp. 1041–1046, Mar. 2010.
- [35] E. O. Hernández-González, J. Sosnik, J. Edwards, J. J. Acevedo, I. Mendoza-Lujambio, I. López-González, I. Demarco, E. Wertheimer, A. Darszon, and P. E. Visconti, "Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 9, pp. 5623–5633, Mar. 2006.
- [36] C. Arnoult, Y. Zeng, and H. M. Florman, "ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization," *The Journal of cell biology*, vol. 134, no. 3, pp. 637–645, Aug. 1996.
- [37] B. Navarro, Y. Kirichok, J.-J. Chung, and D. E. Clapham, "Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa," *The International journal of developmental biology*, vol. 52, pp. 607–613, Jan. 2008.

- [38] J. L. De La Vega-Beltran, C. Sanchez-Cardenas, D. Krapf, E. O. Hernandez-Gonzalez, E. Wertheimer, C. L. Trevino, P. E. Visconti, and A. Darszon, "Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction," *The Journal of biological chemistry*, pp. 1–20, Oct. 2012.
- [39] L. Linares-Hernández, A. M. Guzmán-Grenfell, J. J. Hicks-Gomez, and M. T. González-Martínez, "Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1372, no. 1, pp. 1–12, Jun. 1998.
- [40] C. Patrat, C. Serres, and P. Jouannet, "Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa.," *Biology of reproduction*, vol. 66, pp. 1775–1780, Jun. 2002.
- [41] I. A. Brewis, I. E. Morton, S. N. Mohammad, C. E. Browes, and H. D. Moore, "Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry," *Journal of andrology*, vol. 21, no. 2, pp. 238–429, 2000.
- [42] a Cohen-Dayag, I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, and M. Eisenbach, "Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 24, pp. 11039–11043, Nov. 1995.
- [43] H. . Florman and T. Ducibella, "Florman, H.M., and Ducibella, T. (2006) Fertilization in mammals. In: The Physiology of Reproduction, 3," in *The Physiology of Reproduction*, 3rd ed., J. Neill, Ed. San Diego: Elsevier Press, 2006, pp. 55–112.
- [44] P. Caballero-Campo, M. Chirinos, X. J. Fan, F. Larrea, G. L. Gerton, and M. Galicia-chavarrí, "Biological Effects of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins on Sperm Function 1," *Biology of Reproduction*, vol. 768, no. January, pp. 760–768, 2006.
- [45] G. Machado-oliveira, L. Lefièvre, C. Ford, M. B. Herrero, C. Barratt, T. J. Connolly, K. Nash, A. Morales-garcia, J. Kirkman-brown, and S. Publicover, "Mobilisation of calcium stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised in the female tract," *Nitric Oxide*, vol. 135, no. 22, pp. 3677–3686, 2009.
- [46] P. M. Wassarman, L. Jovine, H. Qi, Z. Williams, C. Darie, and E. S. Litscher, "Recent aspects of mammalian fertilization research.," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 234, pp. 95–103, Apr. 2005.
- [47] World Health Organization, *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, Fifth Edit. Switzerland: WHO Press, 2010.
- [48] E. Mata-Martínez, O. José, P. Torres-Rodríguez, A. Solís-López, A. Sánchez-Tusie, Y. Sánchez-Guevara, M. B. Treviño, and C. L. Treviño, "Measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> changes in human sperm using four techniques: fluorometry , stopped flow fluorometry , flow cytometry and single cell imaging," *Journal of Visualized Experiments*, p. In Press, 2013.

- [49] J. Gould, J. Overstreet, and F. Hanson, "Assessment of human sperm function after recovery from the female reproductive tract," *Biology of reproduction*, vol. 31, no. 15, pp. 888–894, 1984.
- [50] Z. Liu, W. . Bushnell, and R. Brambl, "Potentiometric Cyanine Dyes Are Sensitive Probes for Mitochondria in Intact Plant Cells," *Plant Physiol.*, vol. 84, pp. 1385–1390, 1987.
- [51] M. T. González-Martínez, M. A. Bonilla-Hernández, and A. M. Guzmán-Grenfell, "Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 408, no. 2, pp. 205–210, Dec. 2002.
- [52] Q.-Y. Tang, Z. Zhang, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "Block of mouse Slo1 and Slo3 K<sup>+</sup> channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine.," *Channels (Austin, Tex.)*, vol. 4, no. 1, pp. 22–41, 2010.
- [53] R. W. Sabnis, *HANDBOOK OF BIOLOGICAL DYES AND STAINS*. Madison, NJ: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, p. 210.



En este trabajo se contó con el apoyo técnico de:

La Biól. Erika Isabel Melchy Pérez, técnico académico del Grupo de la Dra. Yvonne Jane Rosenstein (IBT, UNAM); al Biól. Carlos Mojica Cardoso, técnico del área de citometría de flujo en el Hospital del Niño Morelense; y a la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT<< IN202212-3 (CT)>>.