



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PAPEL DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN
ESPERMÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LÓPEZ TORRES AIDEÉ SARAY

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CD. MX., JULIO, 2017.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PAPEL DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN
ESPERMÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LÓPEZ TORRES AIDEÉ SARAY

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JULIO, 2017.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de abril de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **LÓPEZ TORRES AIDEÉ SARAY** con número de cuenta **408014131**, con la tesis titulada **"PAPEL DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN**:

Presidente: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ
Vocal: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
Suplente: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO
Suplente: DR. ENRIQUE OTHON HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 31 de mayo de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la formación recibida durante el desarrollo de mis estudios del doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante el desarrollo de mi proyecto de doctorado (No. de registro 288712) y el financiamiento del proyecto SEP-CONACyT (2010-154923).

A la Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín por su orientación, interés y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por guiar y aportar ideas a este proyecto.

Al Dr. Alberto Darszon Israel por compartir sus conocimientos y experiencia científica para mejorar el proyecto realizado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por haberme permitido trabajar en dichas instalaciones.

A la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, por abrirme las puertas de su laboratorio, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología UNAM, además de su apoyo y su gran contribución para el desarrollo de técnicas que enriquecieron este proyecto.

A los miembros del jurado: la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, la Dra. Elena Zambrano González, la Dra. María Elena Ayala Escobar, la Dra. Laura Elena Díaz Cueto y el Dr. Enrique Othon Hernández González, por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

Al M. en MM. Fabio Herrera Rodríguez, por su aportación y asesoramiento técnico.

A la M. en C. Paulina Torres Rodríguez, por su tiempo, disposición y asesoramiento en las técnicas del laboratorio.

A las personas que me apoyaron en el desarrollo de este proyecto con sus valiosos conocimientos: la M. en C. Teresa de Jesús Zariñán García, el Dr. Eulises Díaz Díaz, el M. en C. Mario Cárdenas León, la M. en C. Leticia González Ibarra, a la Dra. Andrea Olmos Ortiz, a la M. en C. Nancy Noyola Martínez y la M. en C. Isela Martínez Reza.

A la M. en C. Gabriela Hernández Silva, por su asesoramiento y contribución al manejo de las técnicas implementadas en el laboratorio.

A la M. en C. Esperanza Mata Martínez, por su tiempo, paciencia, dedicación y su aporte de conocimientos para la realización de algunas técnicas que se utilizaron en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mariana Segovia Mendoza, por compartir su tiempo y motivarme para continuar este trabajo.

Al Biól. José Arturo Matamoros Volante, por su aportación y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Q.F.B. José Antonio Alvarado Ríos, por su ayuda en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres

A mi abuelita Cruz

A Jesús Ramírez Gil

A mis hermanos, Justino, Andrea, Arturo, Milagros y Karen

Al Sr. Sergio y la Sra. Carmen

Al Sr. Ernesto y la Sra. Fanny

Al Sr. Alejandro y la Sra. Itzu

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1. Aparato reproductor masculino y espermatogénesis.....	3
1.2. Formación del semen	5
1.3. Morfología del espermatozoide humano	6
1.4. La capacitación espermática	8
1.5. Papel de las hormonas del ciclo reproductivo femenino en la capacitación	10
1.5.1. Hormonas esteroideas	10
1.5.2. Hormonas glicoprotéicas.....	11
2. Hipótesis	14
3. Objetivo general	15
4.1. Objetivos específicos.....	15
4. Metodología	16
4.1. Obtención de muestras de semen y procesamiento.....	16
4.2. Caracterización del LH/hCGr en el espermatozoide humano.....	17
4.3. Capacitación de espermatozoides humanos en presencia de gonadotropinas: LH y hCG	18
4.4. Medición de cambios en el potencial de membrana mediante espectrofluorometría	19

4.5.	Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ en población espermática mediante espectrofluorometría	19
4.6.	Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única	20
4.7.	Cuantificación de AMPc total por radioinmunoanálisis	21
4.8.	Cambios en la fosforilación de tirosinas espermáticas	22
4.9.	Evaluación de la movilidad	23
4.10.	Evaluación de la reacción acrosomal	24
4.11.	Análisis estadístico	25
5.	Resultados	26
5.1.	Caracterización del LH/hCGr en el espermatozoide humano.....	26
5.2.	Efectos de la LH sobre variables de la función espermática	28
5.2.1.	Efecto de la LH en el potencial de membrana del espermatozoide	28
5.2.2.	Efecto de la LH en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides	28
5.2.3.	Efecto de la LH en la concentración de AMPc del espermatozoide	35
5.2.4.	Efecto de la LH sobre la fosforilación de tirosinas en el espermatozoide	36
5.2.5.	Efecto de la LH sobre la movilidad espermática	37
5.2.6.	Efecto de la LH sobre la reacción acrosomal	40
5.3.	Efectos de la hCG sobre variables de la función espermática	41
5.3.1.	Efecto de la hCG sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide	41
5.3.2.	Efecto de la hCG sobre la fosforilación de tirosinas en el espermatozoide.....	43
5.3.3.	Efecto de la hCG sobre la movilidad espermática	44
5.3.4.	Efecto de la hCG en la concentración de AMPc en cultivo primario de placenta	46
6.	Discusión	47

7. Conclusiones.....	51
8. Literatura citada	52
Anexo 1.- Artículo de requisito.....	59
Anexo 2.- Artículo de revisión	60
Anexo 3.- Medios y soluciones empleadas.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la estructura del testículo y del túbulo seminífero.....	4
Figura 1.2. Esquema de la morfología del espermatozoide humano.....	8
Figura 4.1. Trazo ilustrativo del registro de las oscilaciones de Ca^{2+} en célula única en espermatozoides humanos	21
Figura 5.1. El LH/hCGr está presente en espermatozoides maduros humanos.....	27
Figura 5.2. Efecto de la LH sobre el potencial de membrana en espermatozoides humanos.....	28
Figura 5.3. Efecto de la LH sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en población de espermatozoides.....	29
Figura 5.4. Efecto de diferentes concentraciones de la LH en las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h evaluado en célula única.....	30
Figura 5.5. Secuencia de imágenes de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante diferentes tiempos y estimulados con LH...	32
Figura 5.6. La LH incrementó la duración y la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 1 h.....	33
Figura 5.7. Efecto de la LH sobre las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 2 h.....	34
Figura 5.8. La LH incrementó la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h.....	35
Figura 5.9. La LH aumentó la producción de AMPc en espermatozoides humanos.....	36
Figura 5.10. La LH aumentó la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas.....	37
Figura 5.11. La LH modificó el patrón de la movilidad espermática.....	38
Figura 5.12. La LH incrementó algunos parámetros cinéticos de movilidad y la hiperactivación.....	40
Figura 5.13. La LH no tuvo efecto sobre la reacción acrosomal.....	41

Figura 5.14. Secuencia de imágenes de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante 4 h y estimulados con hCG.....	42
Figura 5.15. Efecto de la hCG sobre las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h.....	43
Figura 5.16. La hCG no alteró la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas.....	44
Figura 5.17. La hCG no tuvo un efecto sobre la hiperactivación.....	45
Figura 5.18. Efecto de la hCG sobre la concentración de AMPc en células de placenta humana.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Valores de referencia de la espermatobioscopia.....	16
Tabla 4.2. Variables cinéticas evaluadas por el CASA.....	24
Tabla 5.1. Valores de variables cinéticas de la movilidad espermática evaluados por CASA después de 4 h de incubación con LH.....	39
Tabla 5.2. Valores de variables cinéticas de la movilidad espermática evaluados por CASA después de 4 h de incubación con hCG.....	45

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
ACs	Adenilato ciclasa soluble
ACtm	Adenilato ciclasa transmembranal
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
Anti-pY	Anticuerpo anti-fosfotirosina
Anti-tub	Anticuerpo anti-β-tubulina
BSA	Albúmina sérica bovina
cpm	Cuentas por minuto
E2	Estradiol
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
Gs	Proteína G estimulante
Gα_s	Proteína G subunidad α estimuladora
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HSA	Albúmina sérica humana
HTF	Fluido tubárico humano
HTFss	Fluido tubárico humano sin suplementar
LH	Hormona luteinizante
LH/hCGr	Receptor de LH/hCG
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
Pg	Progesterona

PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
pY	Fosforilación de tirosinas
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
tub	β -tubulina
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

Con la finalidad de fecundar, los espermatozoides deben experimentar una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos durante su tránsito a lo largo del tracto reproductor femenino que les permiten alcanzar el ovocito y fusionarse con él, proceso conocido como capacitación. Los cambios asociados con la capacitación son modulados por su interacción con moléculas presentes en el tracto reproductor femenino. Durante la ventana fértil de la mujer, algunas hormonas reproductivas alcanzan sus concentraciones máximas en el suero, como la hormona luteinizante (LH). Dado que los espermatozoides que se preparan para fecundar pueden estar expuestos a LH, el propósito de este trabajo fue caracterizar la presencia del receptor de LH/hCG (LH/hCGr) en espermatozoides humanos y estudiar los efectos de esta hormona sobre algunas variables de función espermática. Nuestros resultados demostraron la presencia del LH/hCGr en el espermatozoide humano y que la LH aumentó consistentemente la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} en esta célula, así como la concentración de AMPc. Además, al estudiar sus efectos sobre la movilidad, se observó una disminución de la movilidad rápida progresiva en todas las concentraciones evaluadas y al ser analizada mediante CASA, la hiperactivación y varios parámetros cinéticos aumentaron en presencia de 500 y 1000 ng/mL de la hormona. Estas dos concentraciones también promovieron la fosforilación en tirosinas de las proteínas del espermatozoide, fenómeno asociado a la capacitación espermática. No obstante, no se observó ningún efecto de LH sobre la reacción acrosomal. Adicionalmente, debido a la similitud estructural de la LH con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y a que ambas hormonas se unen al mismo receptor, se evaluó si la hCG era capaz de modular la función espermática. Sin embargo, no se observó efecto de la hCG sobre el espermatozoide. En conclusión, la evidencia aquí presentada indica que la LH modula varias variables de la función espermática involucradas en la capacitación, lo que sugiere que podría tener un papel importante e inexplorado durante la fecundación humana.

ABSTRACT

In order to fertilize, spermatozoa must undergo physiological and biochemical changes during their transit along the female reproductive tract that enable them to reach the oocyte and fuse with it, process known as capacitation. The changes associated with capacitation are modulated by their interaction with molecules present in the female reproductive tract. During the woman fertile window, some reproductive hormones reach their maximum concentrations in serum, such as the luteinizing hormone (LH). Since spermatozoa preparing to fertilize may be exposed to LH, the purpose of this work was to characterize the presence of LH/hCGr on human spermatozoa and to study the effects of this hormone on some variables of sperm function. Our results demonstrated the presence of LH/hCGr on human sperm and showed that LH consistently increased the duration of Ca^{2+} oscillations in this cell, as well as concentrations of cAMP. Moreover, when studying its effects on motility, a rapid progressive motility decrease was observed in all concentrations tested and, when analyzed by CASA, the hyperactivation and several kinetic parameters augmented in the presence of 500 and 1000 ng/mL of the hormone. These two concentrations also promoted protein tyrosine phosphorylation of sperm proteins, phenomenon associated with sperm capacitation. Nevertheless, no effect of LH on acrosome reaction was observed. Additionally, due to its structural similarity of LH to human chorionic gonadotropin (hCG) and to the fact that both hormones bind to the same receptor, we evaluated whether hCG was able to modulate sperm function. However, there was no effect of hCG on sperm function. In conclusion, evidence here presented indicates that LH modulates several sperm function variables involved in capacitation, suggesting that may have an important and unexplored role during human fertilization.

1. INTRODUCCIÓN

La fecundación consiste en la unión de un óvulo y un espermatozoide para dar origen al cigoto, primera célula del nuevo ser (1). La fecundación depende de una sucesión de eventos que permiten al espermatozoide depositado en la vagina trasladarse hasta el ámpula de la trompa de Falopio para encontrarse con el complejo cúmulo-ovocito. Una vez allí, es necesario que el gameto masculino sea capaz de penetrar el cúmulo oóforo y la zona pelúcida (ZP), que son las vestiduras externas del ovocito, para alcanzar la membrana plasmática y fusionarse con él. Por lo tanto, el espermatozoide es una célula altamente especializada que requiere adaptarse a condiciones externas cambiantes para alcanzar su objetivo de fecundar.

1.1. Aparato reproductor masculino y espermatogénesis

El aparato reproductor masculino está formado por el pene, los testículos, los conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas accesorias (la próstata, la vesícula seminal y las glándulas bulbouretrales). Los testículos son un par de estructuras ovoides que se encuentran en el interior de las bolsas escrotales por fuera de la cavidad abdominal, los cuales contienen túbulos seminíferos, donde ocurre la producción de espermatozoides. Estos túbulos se continúan a través de la rete testis, los conductos eferentes y conectan con el epidídimo, un órgano que se localiza en el borde posterior testicular y que se divide en tres porciones: la cabeza, el cuerpo y la cola; esta última porción desemboca en el conducto deferente (2).

El testículo posee dos funciones principales: la producción y almacenamiento de espermatozoides, y la biosíntesis y secreción de hormonas esteroideas como los andrógenos (2). Estructuralmente, consta de dos compartimientos que son los túbulos seminíferos y el intersticio. En los túbulos seminíferos se localizan las células germinales y las células de Sertoli, las cuales tienen como función proporcionar los nutrientes necesarios para la maduración de las células germinales. Estas células también conforman la barrera hematotesticular, gracias a

la presencia de uniones estrechas entre ellas. En el intersticio se encuentran las células de Leydig, que están en íntimo contacto con los vasos sanguíneos y los linfáticos testiculares y producen principalmente testosterona (2).

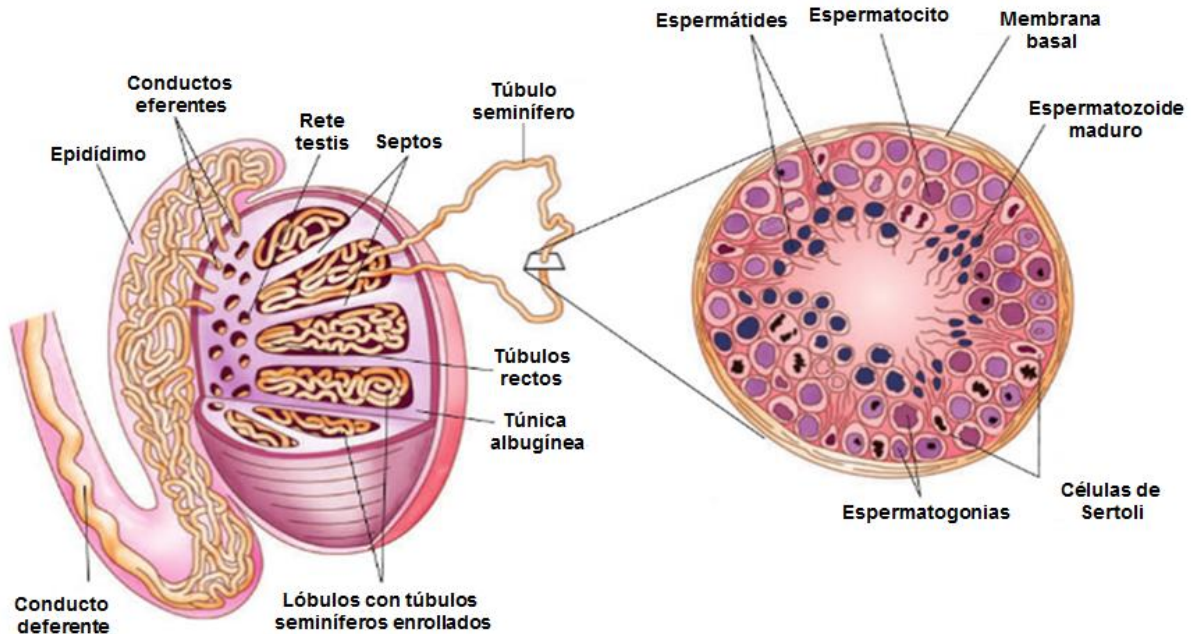


Figura 1.1. Esquema de la estructura del testículo y del tubo seminífero. En el panel izquierdo se muestra la estructura del testículo, epidídimo y parte del conducto deferente. En el panel derecho se muestra una sección transversal del tubo seminífero mostrando células germinales en diferentes etapas de desarrollo. Modificado de Rizzo, 2015 (3).

La espermatogénesis es la transformación de las células madre diploides espermatogoniales en espermatozoides haploides, proceso que tiene lugar en los túbulos seminíferos (Figura 1.1). En el tubo seminífero se encuentran dos compartimentos epiteliales, el basal y el adluminal. En el compartimento basal, las espermatogonias proliferan y se dividen por mitosis (4) para dar origen a espermatocitos primarios que a su vez se dividen mediante meiosis (Meiosis I), los cuales son capaces de atravesar la barrera hematotesticular para pasar al compartimento adluminal y dar origen a los espermatocitos secundarios. A continuación los espermatocitos secundarios inician una segunda división meiótica (Meiosis II) que da origen a cuatro espermátidas haploides redondas. Posteriormente, el proceso continúa con la transformación morfológica de las

espermátidas redondas en espermátidas alargadas maduras, lo cual se conoce como espermiogénesis y que incluye la formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, la condensación de la cromatina debido a la sustitución de histonas por protaminas y la eliminación el exceso de citoplasma (5).

La espermiación consiste en la liberación de los espermatozoides completamente desarrollados a la luz tubular. En ese momento los espermatozoides carecen de movilidad y son incapaces de fecundar. Sin embargo, durante su posterior recorrido por la red testicular, los conductos eferentes, los epidídimos (donde se almacenan hasta la eyaculación) y los conductos deferentes, se nutren de secreciones del epitelio de estas estructuras que completan su maduración, adquiriendo la movilidad característica de esta célula (6).

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo es el encargado de regular la espermatogénesis. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al sistema sanguíneo portal hipofisario que se conecta con la hipófisis, en donde esta hormona estimula la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La LH actúa sobre las células de Leydig para activar la producción y secreción de hormonas sexuales, especialmente testosterona, dihidrotestosterona y estradiol (E2). El 95% de la testosterona se produce por estas células y ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de la LH (7). Por su parte, la FSH se une a sus receptores ubicados en las células de Sertoli para promover la espermatogénesis. Además, la FSH potencia la síntesis de testosterona por las células de Leydig a través de mecanismos parácrinos que implican células de Sertoli (8). La secreción de FSH está regulada por péptidos gonadales inhibidores y activadores (inhibinas y activinas, respectivamente) producidos por las células de Sertoli (7).

1.2. Formación del semen

Las glándulas bulbouretrales, la vesícula seminal, la próstata y el epidídimo tienen como función secretar los fluidos en los que se transportan los espermatozoides, dando lugar al semen. Durante el coito, el semen se deposita en la vagina mediante

la eyaculación. El semen es ligeramente alcalino, con un pH de 7.2 o más, lo cual neutraliza la acidez de la vagina. La primera secreción durante el eyaculado es conocida como el líquido pre-eyaculatorio, el cual es de origen bulbouretral y contiene principalmente mucina, ácido siálico, galactosa y sales. A continuación se libera el semen, donde las diferentes secreciones son expulsadas de manera secuencial. La primera fracción es rica en espermatozoides que se encontraban almacenados en la cola del epidídimo, seguida de las secreciones de la próstata que contienen citrato ácido, zinc, fosfatasa ácida y el antígeno prostático específico. A continuación, hay un dominio gradual de la secreción de la vesícula seminal, que es rica en fructuosa, péptidos, proteínas y prostaglandinas, y donde hay una disminución gradual del número de espermatozoides (9).

Dentro de estas secreciones se han identificado factores descapacitantes, que son moléculas que recubren la superficie de los espermatozoides (10), entre los que se encuentran proteínas como la CRISP1 (11) y glicodelina S (12). Cabe señalar que la cara externa de la membrana plasmática es también rica en carbohidratos que se encuentran unidos a la membrana mediante uniones no covalentes, lo cual se conoce como glicocálix, que enmascaran los sitios de unión de los canales iónicos o de activación celular (13). Asimismo, el plasma seminal contiene diferentes tipos de vesículas incluyendo prostasomas, epididimosomas y liposomas (14). Estos exosomas interaccionan con la membrana plasmática del espermatozoide permitiendo la adquisición de proteínas e induciendo cambios en la composición lipídica de la membrana que son fundamentales para las etapas de reconocimiento y fusión de gametos (14). Además, desempeñan un papel en la regulación de la respuesta inmune de la mujer, misma que podría involucrar pequeños ARN no codificantes (15).

1.3. Morfología del espermatozoide humano

El espermatozoide es una célula móvil que mide aproximadamente 60 μm de largo con una morfología muy característica, en la que podemos diferenciar la cabeza y el flagelo.

a) Cabeza: Es de forma oval y mide unos 5 μm de largo. Fundamentalmente está constituida por el núcleo y el acrosoma, el cual es una vesícula situada junto al núcleo en el extremo apical de la cabeza, que contiene enzimas que permiten la disgregación de las cubiertas del ovocito y como consecuencia de esto es posible la fusión del óvulo con el espermatozoide, mismas que son liberadas por exocitosis en un proceso conocido como reacción acrosomal (16).

b) Flagelo: Proporciona movilidad al espermatozoide y se divide en cuatro segmentos: cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal. El cuello es corto y ligeramente más grueso que las demás partes del flagelo. Mide aproximadamente 2 μm , y en él se encuentran el centriolo proximal y el centriolo distal que da origen al flagelo. La pieza media mide alrededor de 6 μm y en su centro contiene la parte inicial del eje funcional del flagelo llamado axonema, mismo que está rodeado de mitocondrias de manera helicoidal. La estructura del axonema consiste en un par de microtúbulos centrales rodeado por nueve pares de microtúbulos, los cuales a su vez están envueltos por 9 fibras densas externas que están compuestas principalmente por queratina. Las mitocondrias de este segmento proveen de energía al espermatozoide mediante la producción de ATP, necesario para realizar su recorrido por el tracto reproductor femenino. A la última mitocondria le sigue el anillo, que es un aro que señala el final de la pieza media. Luego encontramos la pieza principal, que mide unos 45 μm de largo y está compuesta por el axonema, las nueve fibras densas externas y una capa fibrosa. Por último, está la pieza terminal, de unos 5-7 μm de longitud y conformado sólo por axonema que está en contacto directo con la membrana plasmática (Figura 1.2) (17).

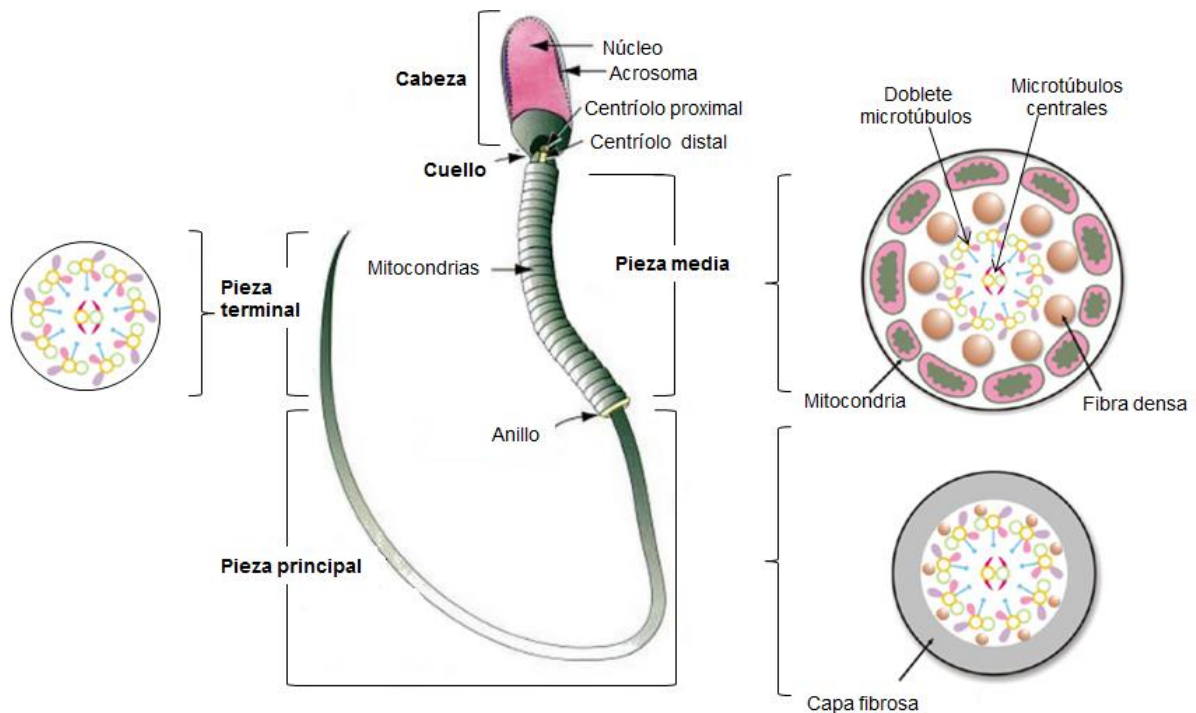


Figura 1.2. Esquema de la morfología del espermatozoide humano. La estructura del espermatozoide comprende la cabeza y el flagelo, que a su vez se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal. Se presentan además cortes transversales de las diferentes secciones del flagelo. Modificado de (17) y (18).

1.4. La capacitación espermática

El espermatozoide recién eyaculado no es capaz de fecundar, pero a su paso por el tracto reproductor femenino se producen cambios que lo hacen competente, fenómeno que se conoce como capacitación (19).

La capacitación se asocia con cambios en las propiedades bioquímicas y biofísicas de los espermatozoides, tales como modificaciones en las características de la membrana plasmática y de la superficie celular, a través de la redistribución de proteínas integrales de membrana (20), la difusión de los lípidos (21), cambios en la distribución de los fosfolípidos (21) y la extracción de colesterol (22), gracias a la albúmina presente en el fluido oviductal (23). Además, se producen cambios en el medio iónico interno como consecuencia del aumento de las concentraciones de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ (24), derivado del influjo de este ion y de la liberación de los depósitos intracelulares del mismo (25), y del ion HCO_3^- (26), todo lo cual deriva en

un aumento del pH_i (27) y la hiperpolarización de la membrana plásmática (28). También se incrementa la producción de adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc) (29, 30), aumentando la fosforilación de diversas proteínas a través de la regulación de proteínas cinasas y fosfatasas (31-33). Esta extensa reprogramación se lleva a cabo tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide (34). Como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides presentan al menos tres eventos que parecen estar relacionados con la capacidad de fecundar: la hiperactivación de la movilidad flagelar (35), la activación de algunas vías de transducción de señales que permiten respuestas a factores quimiotácticos (36), y la capacidad de experimentar la reacción acrosomal (37).

La hiperactivación consiste en el cambio de la movilidad progresiva característica de los espermatozoides recién eyaculados a una movilidad no progresiva con batido flagelar asimétrico y de mayor amplitud (38). Los espermatozoides hiperactivados muestran un patrón de movilidad de alta velocidad que genera la propulsión necesaria para liberarse del epitelio oviductal y penetrar la ZP (39). Durante la hiperactivación, el Ca^{2+} intracelular se une a proteínas en el brazo externo de la dineína en el flagelo, lo que induce el movimiento asimétrico (18).

Al final de la capacitación, el espermatozoide está listo para experimentar la reacción acrosomal (18). Estudios *in vitro* han descrito que el espermatozoide humano puede llevar a cabo la reacción acrosomal de forma espontánea, probablemente como parte del proceso de capacitación (40). Sin embargo, este proceso es estimulado cuando el espermatozoide es expuesto a progesterona (Pg) (41) y a proteínas de la ZP (42).

La capacitación *in vitro* puede lograrse mediante la incubación de espermatozoides en medios que imiten los fluidos del tracto reproductor femenino, los cuales contienen fundamentalmente albúmina sérica, Ca^{2+} y HCO_3^- , además de otros componentes destinados a aportar energía y una adecuada presión osmótica (38).

1.5. Papel de las hormonas del ciclo reproductivo femenino en la capacitación

Los cambios que ocurren durante la capacitación espermática son modulados por su interacción con las moléculas presentes en el tracto reproductivo femenino. Entre otras, algunas hormonas reproductivas alcanzan sus máximas concentraciones en suero durante la ventana fértil, tales como la LH y la FSH. Además, hay un aumento en la concentración de estradiol (E2) en el tracto reproductor femenino (43), mientras que Pg se secreta en concentraciones micromolares por el complejo cúmulo-ovocito (44). En vista de que el espermatozoide puede estar expuesto a estas hormonas durante su recorrido para alcanzar el ovocito, podrían ser moduladoras de la función espermática.

1.5.1. Hormonas esteroideas

Además de regular la maduración de los gametos femeninos, el ovario es también una glándula endocrina que secreta hormonas esteroideas como Pg y E2 que son cruciales para el desarrollo reproductivo normal y la fertilidad. La Pg es mayormente secretada por las células del cúmulo y la granulosa durante la ovulación y por las células del cuerpo lúteo en el ovario durante la fase post-ovulatoria del ciclo menstrual y está relacionada con el embarazo (45). Por otro lado, el E2 es el estrógeno más potente y prevalente producido en mujeres en edad reproductiva no embarazadas. Esta hormona se secreta principalmente por las células de la granulosa en el ovario, con el fin de promover el desarrollo del revestimiento uterino para la implantación del cigoto y la liberación de LH de la hipófisis para desencadenar la ovulación (46).

Se han descrito varios mecanismos de acción de las hormonas esteroideas. En el mecanismo de acción genómico, las hormonas difunden a través de la membrana celular y se unen a los receptores situados en el citoplasma celular y se translocan al núcleo para unirse a secuencias de ADN específicas en la cromatina y ejercer acciones genómicas mediante la modulación de la actividad transcripcional (revisada en (47)). Sin embargo, el espermatozoide maduro es una célula con una cromatina fuertemente condensada, y por lo tanto es transcripcionalmente silente.

En el mecanismo no genómico, las hormonas esteroideas inician la señalización desde el exterior a través de receptores de membrana y produce respuestas en períodos de tiempo cortos (segundos a minutos), mismos que se consideran demasiado rápidos para implicar eventos transcripcionales (48). Durante la capacitación en espermatozoides humanos, la Pg es capaz de inducir el influjo de Ca^{2+} en segundos (49), lo que sugiere que la hormona utiliza mecanismos de acción no genómicos sobre el espermatozoide. Recientemente, se ha descrito que la Pg activa el canal de calcio CatSper (50, 51), a través de la unión y activación del receptor de membrana α/β hidrolase domain containing-protein 2 (ABHD2) que regula la actividad del canal (52, 53).

Los efectos de la Pg sobre la función espermática han sido motivo de muchos estudios, los cuales han demostrado que es capaz de promover la capacitación (54), la quimiotaxis (55), la reacción acrosomal (41), la movilidad hiperactivada (56), el batido flagelar (57, 58), así como la unión del espermatozoide con la ZP y la fusión espermatozoide con el ovocito (59). En cambio, se conoce mucho menos sobre los efectos de E2 en la función espermática. Investigaciones previas apuntan a que esta hormona tiene un efecto estimulante en el eflujo del colesterol del espermatozoide, promueve el influjo de Ca^{2+} del medio extracelular y aumenta la fosforilación de tirosinas en proteínas del espermatozoide (60, 61). Además estudios previos sugieren que incrementa la velocidad y sostiene la movilidad espermática (62).

1.5.2. Hormonas glicoprotéicas

Las gonadotropinas son hormonas polipeptídicas glicoprotéicas que regulan el desarrollo sexual y la función reproductiva, actuando sobre las gónadas controlando la producción de gametos y hormonas sexuales. Las gonadotropinas humanas son la FSH y LH, ambas de origen hipofisario, y la hCG que se produce en la placenta. La liberación de LH y FSH está mediada por la GnRH, la cual es un decapeptido de origen hipotalámico que se une a su receptor localizado en los gonadotropos hipofisarios.

La principal función de la LH en la mujer es inducir la ovulación, y durante la fase lútea del ciclo menstrual estimula la secreción de E2 y Pg por el cuerpo lúteo (63).

La LH y la hCG son hormonas heterodiméricas constituidas por una subunidad α y una β (64). La subunidad α contiene 92 aminoácidos y es idéntica para ambas hormonas, mientras que las subunidades β son específicas para cada hormona y regulan sus funciones fisiológicas y su vida media (65). Debido a su naturaleza proteica, estas hormonas requieren de un receptor en la membrana plasmática para mediar sus efectos. Debido a las similitudes estructurales entre la LH y la hCG, ambas se unen y activan al mismo receptor, si bien tienen patrones temporales divergentes de expresión y evidencias recientes sugieren que desencadenan diferentes cascadas de eventos después de la unión al receptor (66). El LH/hCGr es una glicoproteína con siete pasos transmembranales que está acoplado a proteína G, que tiene un exodominio extracelular responsable de la unión de la hormona de alta afinidad y un endodominio asociado a la membrana donde se produce la activación del receptor (67). Se han descrito diversas variantes del LH/hCGr en el ovario de rata, cerdo y humano, con masas moleculares de ~92, 80, 68, 59, 52 y 48 kDa (68).

En el ovario, la estimulación del LH/hCGr por LH activa 2 vías de señalización intracelular. Una de ellas promueve un aumento en la actividad de AC mediada por las proteínas G intracelulares asociadas a la membrana, que resulta en un incremento de AMPc y en consecuencia activa PKA, que conduce a la síntesis y secreción de hormonas esteroideas (69). La otra implica la estimulación con fosfolipasa C, la formación de fosfatidilinositol y diacilglicerol con el consecuente aumento de $[Ca^{2+}]_i$, así como la activación de PKC (70). Se ha descrito que la LH activa las mismas vías de señalización en células de endometrio de cerdo (71). Estas vías de señalización se han implicado en los mecanismos que conducen a la capacitación del espermatozoide, pero no hay estudios que evalúen los posibles efectos de la LH en este tipo celular.

1.5.2.1. Regulación de la función espermática por LH y hCG

La LH es una de las hormonas reproductivas más marcadamente asociadas con la ventana fértil en las mujeres y está presente en varios fluidos del aparato reproductor femenino, tales como en el moco cervical (72) y en el líquido folicular (73, 74). Además, se ha inferido su presencia en el oviducto debido a la existencia del LH/hCGr en las trompas de Falopio humana (75). Por otra parte, se ha descrito la presencia del LH/hCGr en espermatozoide maduro humano (76), por lo que es posible que regule la capacidad fecundante de los espermatozoides depositados en el tracto reproductivo femenino.

Estudios iniciales realizados en conejos sugirieron que la fertilidad aumentaba cuando los espermatozoides se capacitaban en úteros de conejas previamente inyectadas con hasta 2000 mg de la LH (77). Sin embargo, fue hasta 2001 que se investigó el efecto directo de la LH sobre la función espermática en humano, describiéndose que tanto la LH como la hCG promovieron la actividad de la PKA en el espermatozoide, mientras que la actividad de la PKC no se vio afectada por ninguna de estas hormonas. Además, la hCG fue capaz de aumentar los niveles de AMPc en el espermatozoide humano, si bien la LH no fue evaluada para esta variable (76). Considerando estos resultados, los investigadores sugirieron que la hCG o la LH podrían imitar la vía de AMPc/PKA en el espermatozoide. Sin embargo, el uso indistinguible de la LH y la hCG basado en sus capacidades para unirse al mismo receptor podía haber conducido a interpretaciones erróneas de los resultados. A pesar de lo prometedor de estos resultados, posteriormente no se realizaron más investigaciones sobre el efecto de la LH en la fisiología del espermatozoide humano o de otros mamíferos, permaneciendo como una variable inexplorada de la regulación del proceso de capacitación.

2. HIPÓTESIS

Considerando que la capacitación espermática está modulada por moléculas presentes en el tracto reproductor femenino, la LH secretada durante la ventana fértil de la mujer podría ser un regulador de este proceso.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la LH sobre la función espermática bajo condiciones capacitantes.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar la presencia del LH/hCGr en el espermatozoide humano.
- Determinar si la LH tiene efectos sobre la función espermática, evaluando variables como la concentración de AMPc, la $[Ca^{2+}]$, la fosforilación de tirosinas de las proteínas, la movilidad y la reacción acrosomal.
- Estudiar el posible papel de la hCG sobre la función espermática.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de muestras de semen y procesamiento

Las muestras de semen utilizadas en este estudio se obtuvieron por masturbación de donantes sanos con 3-5 días de abstinencia, tras la autorización del Comité de Ética en Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las mismas se dejaron licuar a 37°C durante 30 min y se evaluaron utilizando los lineamientos plasmados en el Manual de Laboratorio para la Examinación de Semen Humano y la Interacción Espermatozoide-Moco Cervical publicado por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (78). Sólo se emplearon las muestras que fueron clasificadas como normozoospermicas de acuerdo a los parámetros establecidos en dicho Manual, los cuales se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de referencia de la espermatobioscopia (78)

Parámetro	Valores de referencia
Licuefacción	Total a los 60 min
pH	≥ 7.2
Volumen	≥ 2.0 mL
Concentración espermática	≥ 20 x 10 ⁶ / mL
Número total de espermatozoides	≥ 40 x 10 ⁶ por eyaculado
Movilidad progresiva	≥ 50 %
Viabilidad	≥ 50 %
Morfología	≥ 15 % formas normales

Posteriormente, con la finalidad de separar los espermatozoides del plasma seminal, las muestras de semen se centrifugaron a través de gradientes discontinuos de Percoll (Isolate™; Irvine Scientific, Irvine, CA) y los botones celulares obtenidos se lavaron con medio de cultivo basado en el fluido tubárico humano (*Human Tubal Fluid*; HTF) suplementado con 0.3% de albúmina sérica

humana y 0.33 mM de piruvato de sodio (78), antes de su uso en los diferentes procedimientos descritos en el presente trabajo. Para los estudios de cambios en el potencial de membrana y la $[Ca^{2+}]_i$ en célula única, los espermatozoides se separaron del plasma seminal mediante la técnica de *swim up* (78), para lo cual se colocaron 500 μ L de semen en el fondo de tubos de ensayo a los que se les añadieron 1 mL de HTF, cuidando que no se mezclaran las dos fases. A continuación, se dejaron incubar durante 1 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad y se recuperaron las fases superiores conteniendo los espermatozoides móviles que nadaron hacia arriba. Únicamente las muestras que tuvieron al menos 80% de movilidad total después del procesamiento se utilizaron para los experimentos.

4.2. Caracterización del LH/hCGr en el espermatozoide humano

El LH/hCGr en el espermatozoide humano se caracterizó mediante inmunofluorescencia y Western Blot. Para la inmunofluorescencia, los espermatozoides se fijaron con etanol al 70% y se colocaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Las preparaciones se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% diluida en PBS durante 1 h para el bloqueo de uniones inespecíficas, se lavaron 3 veces con PBS y a continuación se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo anti-*Luteinizing Hormone-Choriogonadotropin Receptor* (anti-LH/hCGr; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de humano preparado en conejo. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a incubar con anticuerpo secundario anti-rIgG-FITC (Zymed, San Francisco, CA) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar, las preparaciones se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se analizaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51), utilizando un filtro de excitación de 460-495 nm y emisión de 510-550.

En cuanto al Western Blot, las proteínas de espermatozoides se obtuvieron solubilizando botones celulares equivalentes a 1×10^6 de células con 15 μ L de solución amortiguadora desnaturante para proteínas (ver Anexo 3), los cuales se

mantuvieron a -4°C hasta el momento del análisis. Posteriormente se descongelaron, se hirvieron durante 10 min, y finalmente se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se cargaron en pozos de geles desnaturalizantes al 10% de acrilamida (SDS-PAGE) para su separación y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se bloquearon mediante su incubación con BSA al 3% en solución amortiguadora de TBS-Tween20 (0.1%), y a continuación se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti-LH/hCGr, diluido 1:1000. Luego de lavar 3 veces para remover el anticuerpo primario no unido, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo preparado en cabra y acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en una dilución 1:4000. Por último, luego de lavar 3 veces, la unión específica del anticuerpo primario a las proteínas en las membranas se reveló mediante quimioluminiscencia, empleando como sustrato el kit ECL Prime (GE Healthcare, Reino Unido) y detectado en el aparato Chemi DocTM XRS+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

4.3. Capacitación de espermatozoides humanos en presencia de gonadotropinas: LH y hCG

Para estudiar los efectos de la hormona sobre la función espermática, los espermatozoides se incubaron bajo condiciones capacitantes mediante la resuspensión en HTF a una densidad de $10 \times 10^6/\text{mL}$, seguido de incubaciones a 37°C , con 5% de CO_2 y 95% de humedad, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de LH de hipófisis humana (Sigma-Aldrich o estándar de la O.M.S.) o de hCG (Sigma-Aldrich). Debido a que las concentraciones fisiológicas de LH en el tracto reproductor de la mujer no se han descrito, utilizamos como referencia los valores séricos, los cuales varían entre aproximadamente 100 ng/mL que se observa de forma basal durante la mayor parte del ciclo menstrual de mujeres entre 18-30 años de edad y que asciende a un valor medio de 750 ng/mL (rango: 500-900 ng/mL) durante el pico preovulatorio (79). Al final de las incubaciones, los espermatozoides se procesaron de acuerdo a los procedimientos que se describen

a continuación para cada uno de los ensayos funcionales. Adicionalmente, como control, se realizaron ensayos en presencia de concentraciones equimolares de la hCG con respecto a la LH.

4.4. Medición de cambios en el potencial de membrana mediante espectrofluorimetría

Para evaluar cambios en el potencial de membrana de espermatozoides humanos, las células se capacitaron durante 1 h y a continuación se centrifugaron para resuspenderlas en HTF sin suplementar (HTFss) a una concentración de 6×10^6 de espermatozoides/mL, para añadirles $1 \mu\text{M}$ de cianina DiSC3 (5) (Invitrogen; Eugene, OR), las células se estimularon en presencia o en ausencia de LH y se procedió a registrar los cambios en la intensidad de fluorescencia en un espectrofluorómetro de la marca SLM-AMINCO, operado con el software de adquisición OLIS Global Works. Para ello, inicialmente se adicionó valomicina para hiperpolarizar el potencial de membrana. Una vez estabilizado el trazo, se hicieron adiciones secuenciales de concentraciones conocidas de KCl para depolarizar el potencial de membrana con concentraciones finales de 4, 5.25, 7.75, 12.75 y 22.75 mM, correspondientes a los valores teóricos del potencial de membrana -91, -84, -73, -60 y -44 mV, respectivamente. Los valores obtenidos se utilizaron para construir una curva estándar y calcular el potencial de membrana de las muestras mediante la ecuación de Nernst. El potencial final de la membrana celular se obtuvo interpolando linealmente los valores teóricos del potencial de membrana versus unidades arbitrarias de fluorescencia (80).

4.5. Medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en población espermática mediante espectrofluorimetría

Para cada condición evaluada se utilizaron 5×10^6 espermatozoides capacitados, los cuales se preincubaron con $2 \mu\text{M}$ de Fluo-3 AM (Invitrogen; Eugene, OR) HTFss durante 30 min a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad. Después, las células se lavaron para remover el colorante que no se incorporó y se resuspendieron en un volumen de 1 mL de HTF. Inmediatamente, se transfirieron al espectrofluorómetro y

durante los primeros 30 seg se registró la fluorescencia basal de las células. Posteriormente se agregó HTF o LH a diferentes concentraciones para hacer el registro. Luego de 120 seg, se añadió 4 μM de Pg como control positivo del influjo de Ca^{2+} . Durante todo el registro, la muestra se mantuvo en agitación a 37°C. Los valores crudos de intensidad de fluorescencia se normalizaron utilizando la ecuación: F/F_0-1 , donde F es la intensidad de fluorescencia a un tiempo determinado y F_0 es la fluorescencia basal antes de cualquier adición (81). La serie total de F/F_0-1 se representa en función del tiempo.

4.6. Mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única

Los análisis de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única se realizaron como se ha descrito previamente (81). Los espermatozoides se marcaron con 2 μM de Fluo-3 AM (Invitrogen; Eugene, OR) en HTFss durante 30 min a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad. Después las células se lavaron para remover el colorante no incorporado y los espermatozoides se adhirieron por la cabeza a cubreobjetos tratados con poly-L-lysina 0.03% (w/v). Los cubreobjetos se montaron en una cámara de registro (Harvard Apparatus; Holliston, MA) que se coloca en la plataforma con temperatura regulada de un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX71), el cual está acoplado a una cámara iXon 888. Los videos fueron adquiridos utilizando un objetivo de 60X y el software IQ (Andor Bioimaging; Wilmington, NC), colectando las imágenes cada 500 mseg. El diseño experimental consistió en el registro de fluorescencia desde el tiempo 0 seg, seguido de la adición del estímulo (ya sea HTF usado como control, LH o hCG) en el segundo 60. Posteriormente, se agregó 3 μM de Pg al segundo 360 como control positivo, seguido de 5 mM de MnCl_2 al segundo 450 para apagar la fluorescencia (ver Figura 4.1). Los registros totales fueron de 480 segundos y las series se representaron en función del tiempo. Los valores crudos de la intensidad de fluorescencia se obtuvieron con el software Image J y posteriormente se normalizaron. La intensidad de fluorescencia se expresó como porcentaje usando la ecuación: $(F_X - F_{\text{Min}}) \times 100 / (F_{\text{Pg}} - F_{\text{Min}})$, donde F_X es el valor de fluorescencia (F) en cualquier momento del registro, F_{Min} es el valor de la intensidad mínima observada durante el primer minuto

(control) y F_{Pg} es la fluorescencia máxima obtenida después de la adición de Pg (considerado como el 100 %). Solamente las oscilaciones con una amplitud superior al 10% sobre la línea basal fueron consideradas. Para cada oscilación, se calculó su amplitud y duración como se indica en la Figura 4.1.

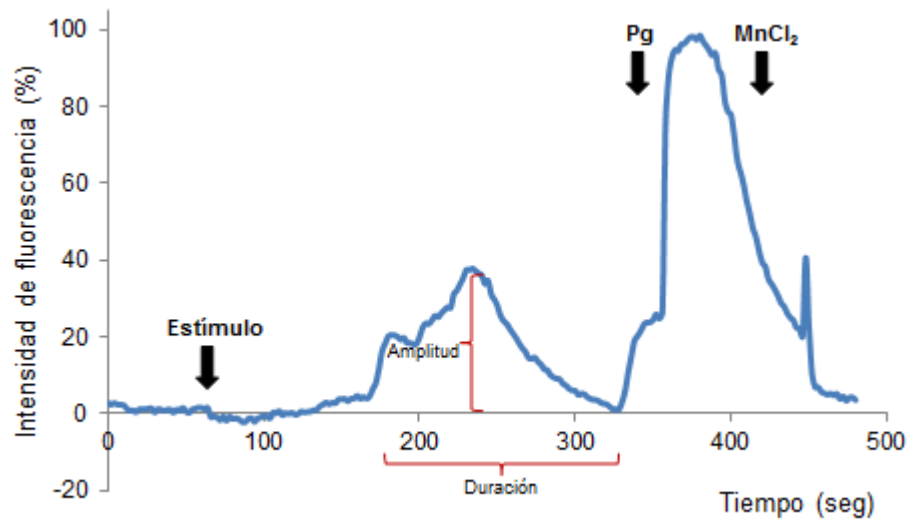


Figura 4.1. Trazo ilustrativo del registro de las oscilaciones de Ca^{2+} en célula única en espermatozoides humanos. En la figura se muestra la estimación de la amplitud y duración de las oscilaciones de Ca^{2+} . La amplitud corresponde a la intensidad de fluorescencia, mientras que la duración al tiempo en segundos. Los espermatozoides se registraron durante un tiempo total de 480 seg. Al segundo 60 se añadió el estímulo (HTF/LH/hCG), al segundo 360 se añadió Pg y luego se añadió $MnCl_2$. Las flechas negras indican cada una de las adiciones.

4.7. Cuantificación de AMPc total por radioinmunoanálisis

Para determinar la producción de AMPc en espermatozoides se empleó la técnica de radioinmunoanálisis por competencia. Los espermatozoides ($6 \times 10^6/400 \mu L$) se incubaron durante 1 h bajo condiciones capacitantes. Al final de las incubaciones, se les añadió una solución al 20% de Tritón X-100 para llevarlas a concentración final de 0.2% y se incubó hielo durante 15 min. Posteriormente se realizaron 5 ciclos de congelación y descongelación rápida, e inmediatamente los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min. Se recuperaron los sobrenadantes de

cada una de las muestras y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Como control positivo para los experimentos con hCG, se llevó a cabo un procesamiento similar con cultivo primario de trofoblasto (células de placenta) estimulado durante 1 h con 7692 ng/mL de hCG (equivalente a 100 UI/mL) (82).

Posteriormente, las muestras se descongelaron, se hirvieron durante 3 min, y se acetilaron con anhídrido acético y trietilamina (1:2), así como también la curva estándar de AMPc (en concentraciones nM) que se construye a partir del stock que acompaña al anticuerpo específico anti-AMPc (Calbiochem, La Jolla, CA). Previamente, se debe haber marcado AMPc con ^{125}I siguiendo los procedimientos previamente descritos (83). En tubos de ensayos, se colocaron 25 μL de AMPc marcado con ^{125}I (400 cpm/ μL), 25 μL de anti-AMPc diluido 1:1000 en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM con BSA al 0.1% (pH 6.1) y 50 μL de estándar de AMPc o la muestra a evaluar, diluidas en solución amortiguadora de acetato de sodio 5 mM (pH 4.7). A continuación, se incubaron los tubos a 4°C por 24 h. Luego, las muestras fueron sometidas a precipitación etanólica seguida de centrifugación a 4°C y se cuantificaron las cpm en un contador de centelleo. Los datos se procesaron utilizando la siguiente ecuación: $\text{Conc} = [(x)(\text{Fd})/V]/n$, donde x = valor obtenido del contador de centelleo (cpm), Fd = factor de dilución, V = volumen final y n = número de células. Los datos están expresados como la relación de nM de AMPc/ 1×10^6 de espermatozoides.

4.8. Cambios en la fosforilación de tirosinas espermáticas

La técnica de Western Blot se utilizó para estudiar la fosforilación de tirosinas en las proteínas del espermatozoide en presencia/ausencia de LH o hCG. Para ello, las muestras se procesaron como se describió en la sección 4.2, y se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas 4G10 (Millipore; Temecula, CA), diluido 1:5000 en TBS-Tween20 (0.1%), seguido de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón preparado en cabra y acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (Zymed) en una dilución 1:4000. Como control de la homogeneidad de la carga, las membranas se reincubaron con anti- β -tubulina (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:50000. Luego de revelar por quimioluminiscencia, los resultados se

analizaron mediante densitometría utilizando el software Image Lab versión 4 (Image Lab™ Software; Bio-Rad). Los resultados se expresaron como la densidad relativa de la fosforilación de tirosinas/ β -tubulina (pY/tub). A los valores obtenidos a las 4 h de incubación en ausencia de LH o hCG se les asignó arbitrariamente el valor de 1 para normalizar los otros valores de intensidad.

4.9. Evaluación de la movilidad

Los espermatozoides se incubaron en HTF en ausencia o presencia de LH durante 4 h y se evaluaron mediante observación al microscopio de contraste de fases (Olympus CX31) para clasificar la movilidad espermática de acuerdo a los criterios establecidos por la O.M.S., como rápida progresiva (A), lenta progresiva (B), no progresiva (C) o inmóvil (D) (78). Para determinar el porcentaje de cada tipo de movilidad, se evaluaron como mínimo 100 células por cada condición experimental.

Adicionalmente, se evaluó la movilidad espermática mediante un sistema CASA (*Computer Aided Semen Analysis*) modelo Sperm Class Analyzer® (SCA®; MICROPTIC S.L.), el cual evalúa las variables cinéticas que se mencionan en la Tabla 4.2. Para ello, las muestras se colocaron en laminillas con cámaras para conteo de células (Leja Products B.V.; Holanda), en los que se capturaron videos de 0.5 seg (50 imágenes/seg) de cada campo en un mínimo de 10 campos y 300 espermatozoides por cada condición evaluada. Los valores de las variables cinéticas obtenidas para las células de cada condición experimental fueron promediados. Los datos de las variables cinéticas también se utilizaron para estimar el porcentaje de células hiperactivadas, utilizando como valores de corte $VCL \geq 150$, $LIN \leq 50$ y $ALH \geq 3.5$, siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo. Los datos se normalizaron asignando arbitrariamente el valor de 1 a los valores obtenidos en ausencia de hormona y los resultados experimentales se expresaron como las veces de cambio de los tratamientos con respecto al control.

Tabla 4.2. Variables cinéticas evaluadas por el CASA (78)

	Variables cinéticas	Unidades
VCL	Velocidad curvilínea	µm/s
VSL	Velocidad rectilínea	µm/s
VAP	Velocidad promedio	µm/s
LIN	Linealidad (VSL/VCL)	%
STR	Rectitud (VSL/VAP)	%
WOB	Oscilación (VAP/VCL)	%
ALH	Desplazamiento lateral de la cabeza	µm
BCF	Frecuencia de cruce	Hz

4.10. Evaluación de la reacción acrosomal

Para estudiar los efectos sobre la reacción acrosomal, se evaluaron la reacción acrosomal espontánea y la inducida farmacológicamente. La reacción acrosomal espontánea se evaluó luego de capacitar los espermatozoides durante 4 h en presencia o en ausencia de LH. En cuanto a la reacción acrosomal inducida, al final de la capacitación a los espermatozoides se les añadió 10 µM de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 20 min (42). Luego de las incubaciones, las células se lavaron con PBS y se fijaron con etanol al 70%. Posteriormente se hicieron frotis en laminillas pre-tratadas con poly-L-lisina y se tiñeron con 20 µg/mL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con fluoresceína (FITC-PSA, Sigma-Aldrich) preparada en PBS y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, las preparaciones se montaron con Vectashield y con ayuda del microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) se evaluó el estatus de los acrosomas, según los criterios de evaluación previamente descritos (42), para determinar el porcentaje de células con reacción acrosomal. Para cada condición experimental se analizó un mínimo de 200 espermatozoides.

4.11. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm EE para los estudios con $n \geq 3$ experimentos independientes. Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett's para comparación de grupos. Los resultados de las mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ y movilidad por CASA se analizaron mediante la prueba de t-pareada. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización del LH/hCGr en el espermatozoide humano

La existencia del LH/hCGr en el espermatozoide humano y su localización subcelular se investigó mediante inmunofluorescencia y Western blot. Los análisis de inmunofluorescencia revelaron la presencia del LH/hCGr en espermatozoide humano, distribuido en flagelo y pieza media, y en algunos casos adicionalmente en la región ecuatorial. Esto permitió evaluar la incidencia de dos patrones de localización: en flagelo y pieza media (Figura 5.1.A.a); y en flagelo, pieza media y región ecuatorial (Figura 5.1.A.b). Como control negativo se utilizaron espermatozoides incubados con suero normal de conejo en vez de anticuerpo primario (5.1.A.c), mientras que como control positivo se utilizó la línea celular de cérvix SiHa (5.1.A.d), la cual mostró señal positiva para el receptor en toda la membrana de las células. En la Figura 5.1.B se muestra la abundancia relativa de los dos patrones de distribución del receptor, donde ambos suman alrededor del 80% de las células teñidas, sin predominancia de ninguno de ellos. En la Figura 5.1.C se muestra un Western blot realizado para la detección del LH/hCGr en espermatozoides, utilizando como control positivo un extracto total proteínas de la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) (84). Tanto en el control positivo como en espermatozoides se detectaron dos bandas de 53 y 48 kDa. Estas bandas podrían corresponder a isoformas del receptor, ya que se ha descrito la existencia de variantes del mismo con diversas masas moleculares en el ovario de humano (68).

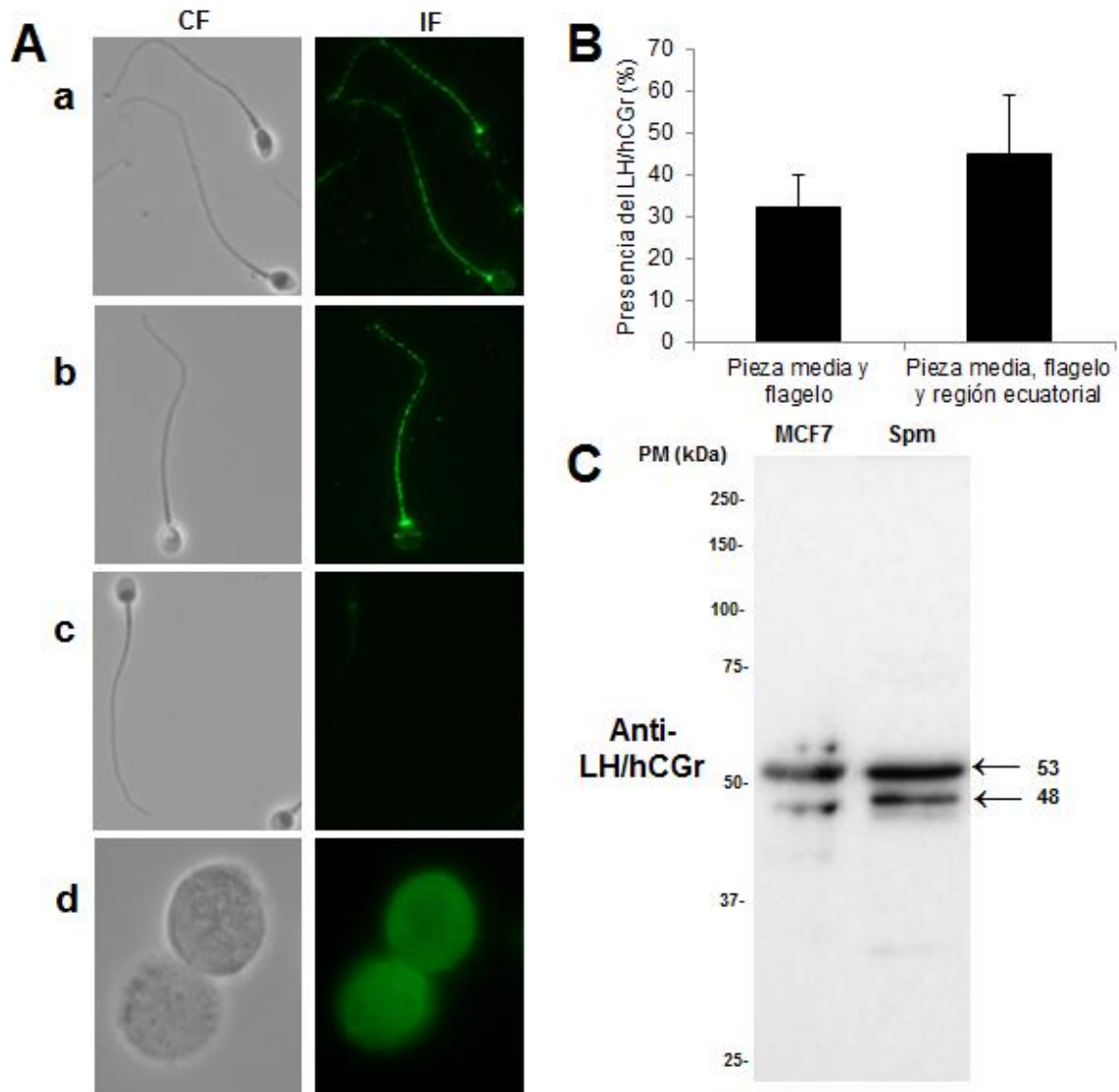


Figura 5.1. El LH/hCGr está presente en espermatozoides maduros humanos. (A) Inmunolocalización del LH/hCGr: (a) Presencia del LH/hCGr en flagelo y pieza media del espermatozoide; (b) Presencia del LH/hCGr en el espermatozoide, localizado en flagelo, pieza media y región ecuatorial; (c) Control negativo: Espermatozoides incubados con suero normal de conejo en vez de anticuerpo primario; (d) Control positivo: Línea celular SiHa. CF: contraste de fases; IF: inmunofluorescencia. (B) Abundancia relativa de los dos patrones de distribución del LH/hCGr en el espermatozoide (n=5). (C) Western blot de lisado total de células MCF-7 y espermatozoides humanos (Spm) con anti-LH/hCGr.

5.2. Efectos de la LH sobre variables de la función espermática

5.2.1. Efecto de la LH en el potencial de membrana del espermatozoide

Durante la capacitación se observa un aumento de la hiperpolarización de la membrana, como consecuencia del flujo de iones a través de la misma, principalmente por la entrada de iones Ca^{2+} , K^+ y la salida de iones Cl^- (85, 86). Por lo tanto, si la LH tiene efectos a nivel de la membrana del espermatozoide, estos podrían reflejarse en cambios en su potencial de membrana. En la Figura 5.2 se muestra el cambio en el potencial de membrana inducido por la hormona, en donde se observa que va de -61 mV en ausencia de la hormona a -82 mV en presencia de la LH (1000 ng/mL), aumentando la hiperpolarización. Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito para espermatozoides capacitados de humano, que es de -58 ± 2 mV (86). Este experimento exploratorio nos permitió inferir que la LH en el espermatozoide humano podría modular el flujo de iones, por lo que procedimos a evaluar sus efectos sobre el Ca^{2+} intracelular.

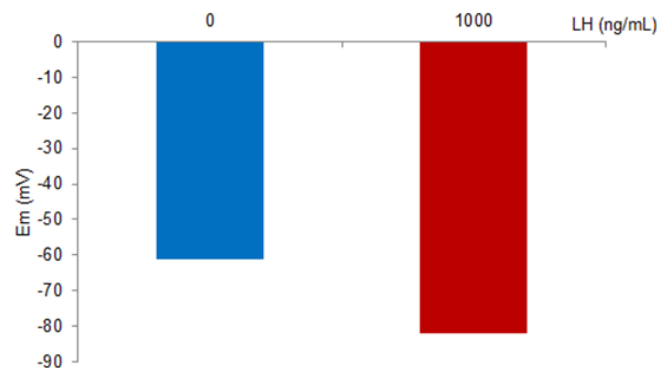


Figura 5.2. Efecto de la LH sobre el potencial de membrana en espermatozoides humanos.

Los espermatozoides fueron recuperados mediante la técnica de *swim-up* y se les añadió HTF (control negativo) y LH (1000 ng/mL) para el registro de los cambios en el potencial de membrana (E_m) ($n=1$).

5.2.2. Efecto de la LH en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides

En consecuencia del resultado anterior, decidimos evaluar el posible papel de la LH sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Para ello se realizó un experimento en población de

espermatozoides mediante espectrometría convencional en donde se observó que al realizar la adición de 2000 ng/mL de la hormona había un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 5.3), sugiriendo que la hormona podría modular esta variable.

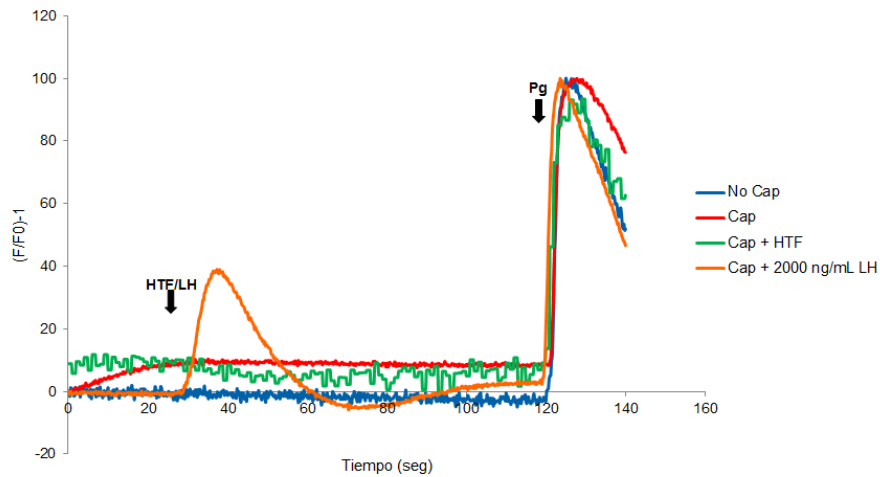


Figura 5.3. Efecto de la LH sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en población de espermatozoides. Trazos de fluorescencia en función del tiempo que muestran los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$. Como control positivo del influjo de Ca^{2+} se agregó 4 μM de Pg. Se muestran los trazos de espermatozoides no capacitados (No Cap), capacitados (Cap) y capacitados a los cuales se le añadió HTF o LH. Las flechas indican la adición de HTF/LH y Pg, (n=1).

Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las células en las muestras de semen, los estudios en población pueden enmascarar efectos que ocurren en subpoblaciones de células (81). Por tanto se decidió realizar un análisis de los efectos de la LH sobre la $[Ca^{2+}]_i$ registrando las respuestas en célula única. En la Figura 5.4.A se muestran trazos representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante 4 h y estimulados con diferentes concentraciones de la hormona. En ausencia de la hormona, se observa que las células presentan oscilaciones espontáneas de baja magnitud, características en espermatozoides humanos cuando son incubados bajo condiciones capacitantes (87). En presencia de LH, se observó un aumento aparente en la magnitud de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$, si bien el porcentaje de células que presentaron oscilaciones de Ca^{2+} no fue diferente entre el control y los tratamientos (Figura 5.4.B). En

consecuencia, estimamos la amplitud y la duración promedio de las oscilaciones registradas en tres experimentos independientes, observándose que la LH modificó la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} (en 2 experimentos aumenta y en uno disminuye) (Figura 5.4.C), mientras que la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} aumentó consistentemente a las concentraciones evaluadas (Figura 5.4.D).

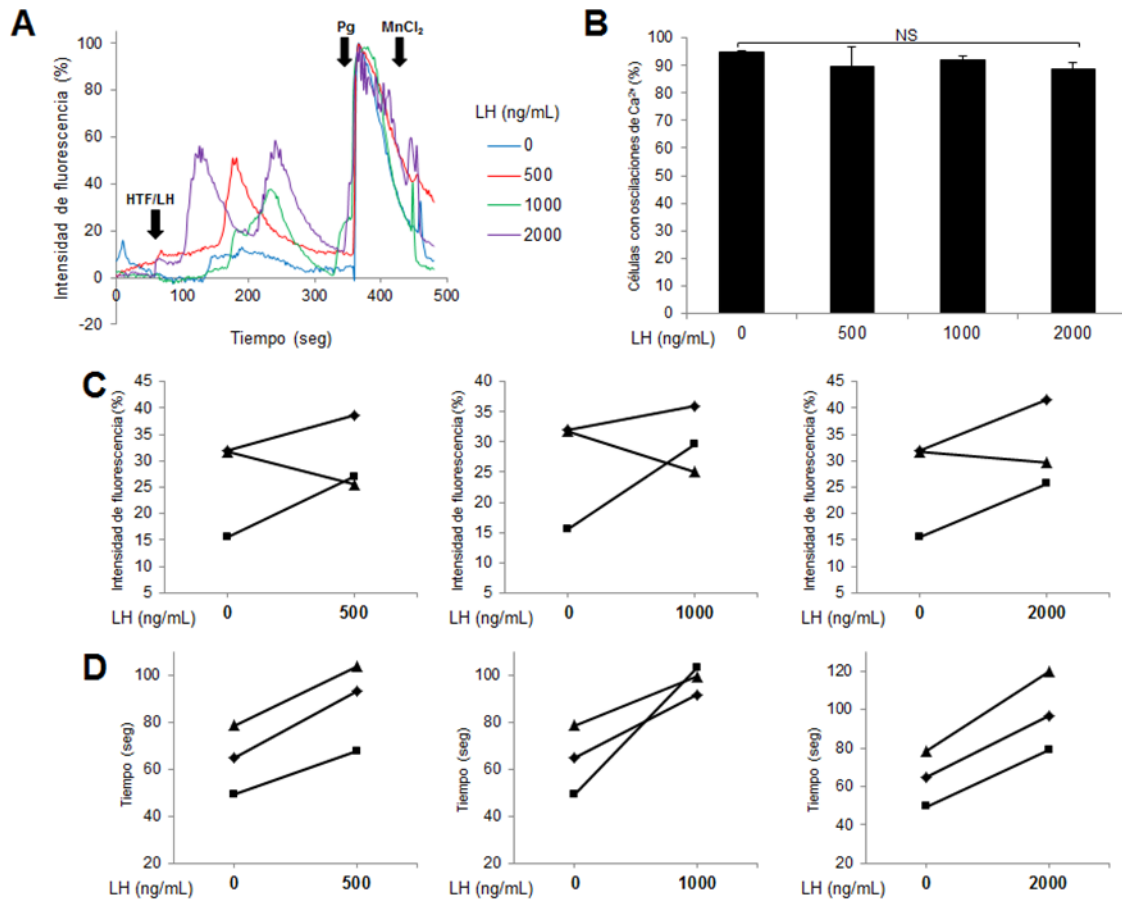


Figura 5.4. Efecto de diferentes concentraciones de la LH en las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h evaluado en célula única. (A) Trazos representativos de intensidad de fluorescencia de cuatro células después de la adición de HTF sólo o con diferentes concentraciones de LH. (B) Porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} después de ser estimuladas con HTF o LH, NS: no significativo estadísticamente. (C) Amplitud y (D) Duración de las oscilaciones de Ca^{2+} después de la adición de HTF o LH (n=3).

Por otra parte, decidimos estudiar si los efectos de LH sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variaban en función del tiempo de capacitación, evaluando las respuestas a 1, 2 y 4 h de

incubación empleando la LH a la concentración de 1000 ng/ml. La secuencia de imágenes mostrada en la Figura 5.5.A, C y E muestran espermatozoides capacitados durante 1, 2 y 4 h respectivamente, a los cuales se le añadió HTF las cuales mostraron oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ consideradas como basales. Por su parte, en la Figura 5.5.B, D y F se muestran espermatozoides que se estimularon en paralelo con LH, donde se puede observar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de mayor intensidad en comparación con los que se estimularon con HTF. Adicionalmente, se observó que la respuesta a Pg también es de mayor magnitud en células estimuladas con LH que con HTF.

Por lo tanto, se examinaron los trazos individuales de los espermatozoides capacitados a los diferentes tiempos y que se estimularon con HTF o LH. A 1h de capacitación, se observó que las células estimuladas con HTF muestran una sola oscilación espontánea durante el tiempo de registro, mientras que en presencia de LH las células presentan una oscilación inmediata que en algunos casos está seguida de una segunda oscilación (Figura 5.6.A). Por lo tanto, investigamos si la LH podría tener efectos sobre la duración y la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} (Figuras 5.6.B y C), observándose que ambas variables incrementan de manera consistente en presencia de la hormona. Cabe mencionar que, al igual que a 4 h de capacitación, se observó que no todas las células presentan cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y que al comparar el porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides tratados con HTF y con LH no se observan diferencias (Figura 5.6.D).

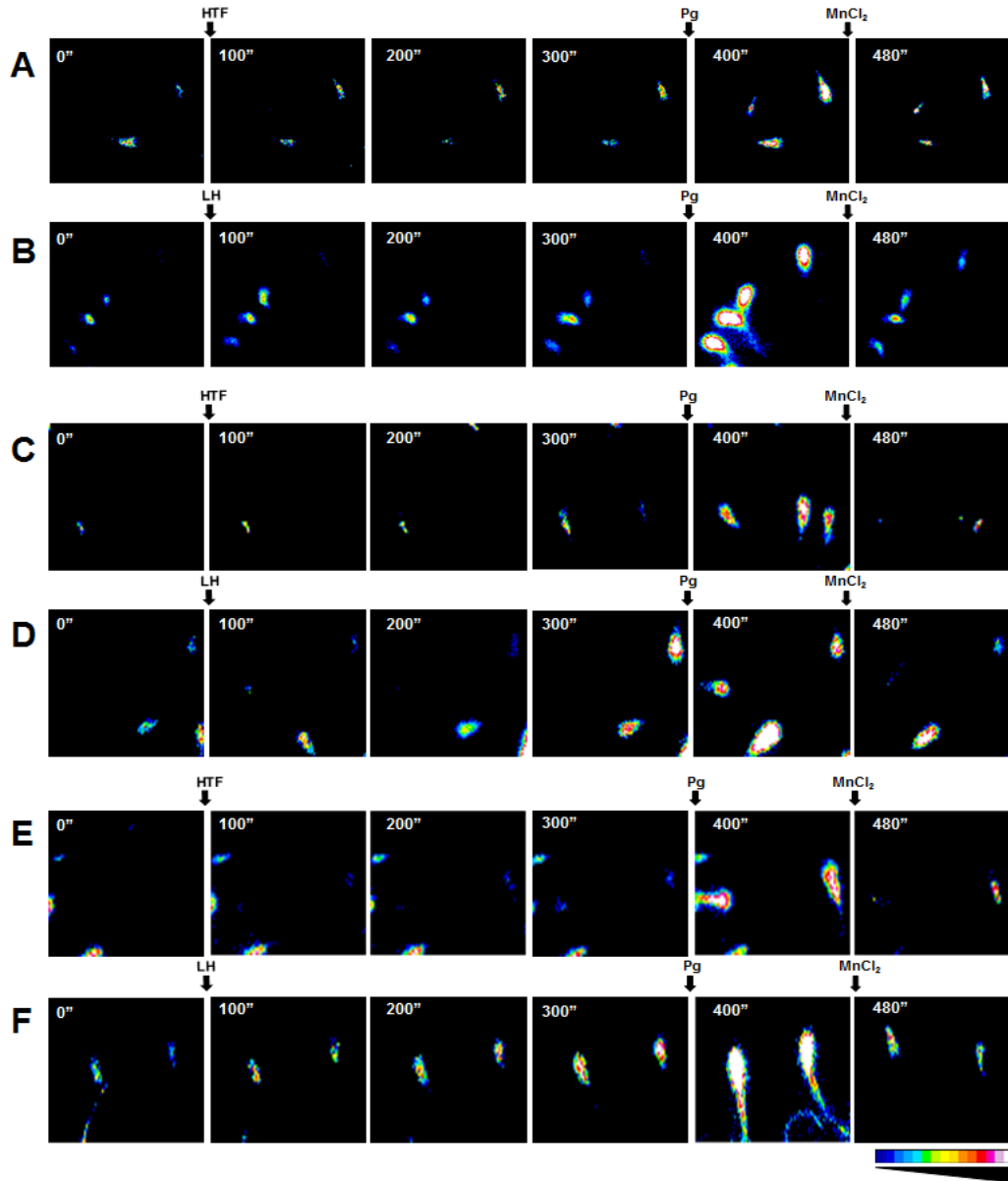


Figura 5.5. Secuencia de imágenes de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante diferentes tiempos y estimulados con LH. Los espermatozoides se registraron durante un tiempo total de 480 seg. Al segundo 60, se añadió HTF/LH y al segundo 360 se añadió Pg como control positivo, seguido de $MnCl_2$ que se utilizó para apagar la fluorescencia. (A) Espermatozoides capacitados durante 1 h y estimulados con HTF. (B) Espermatozoides capacitados durante 1 h y estimulados con LH (1000 ng/mL). (C) Espermatozoides capacitados durante 2 h y estimulados con HTF. (D) Espermatozoides capacitados durante 2 h y estimulados con LH (1000 ng/mL). (E) Espermatozoides capacitados y durante 4 h estimulados con HTF. (F) Espermatozoides capacitados durante 4 h y estimulados con LH (1000 ng/mL).

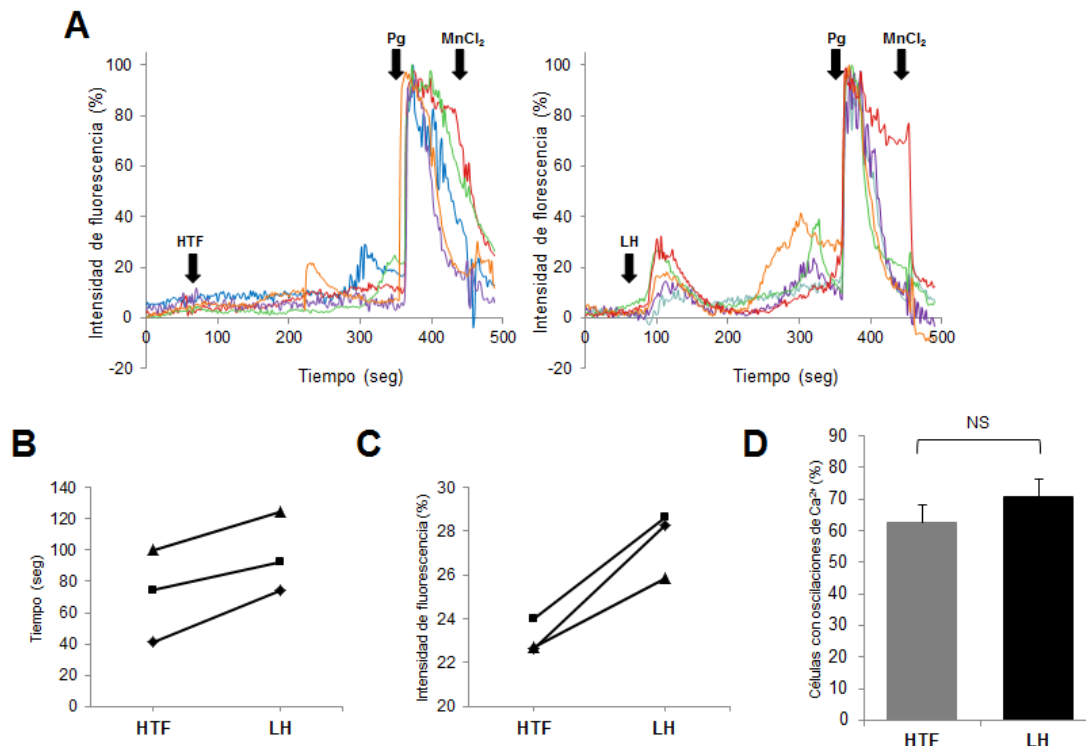


Figura 5.6. La LH incrementó la duración y la amplitud de las oscilaciones de Ca²⁺ en espermatozoides capacitados durante 1 h. (A) Trazos representativos de intensidad de fluorescencia de cinco células después de la adición de HTF (control) o LH (1000 ng/mL). (B) Duración y (C) Amplitud promedio de las oscilaciones de Ca²⁺ después de la adición de HTF o LH ($p < 0.05$ HTF vs LH). (D) Porcentaje de células con oscilaciones de Ca²⁺ después de ser estimuladas con HTF o LH; NS: no significativo estadísticamente (n=3; HTF: 51 espermatozoides, LH: 58 espermatozoides).

En cuanto a los espermatozoides que se capacitaron durante 2 h, en la figura 5.7.A se muestran trazos representativos de 5 células estimuladas con HTF o LH, donde se muestra que al igual que a 1 h de capacitación, la LH indujo una respuesta inmediata en la $[Ca^{2+}]_i$ y en algunos casos se observa una segunda oscilación. Al caracterizar dichas oscilaciones, en la figura 5.7.B se muestra que LH aumentó la duración, mientras que la amplitud aumentó en dos experimentos y en uno disminuyó (Figura 5.7.C). Igualmente evaluamos el porcentaje de células con

oscilaciones de Ca^{2+} , observándose una tendencia a aumentar en presencia de LH, pero no fue estadísticamente significativo (Figura 5.7.D).

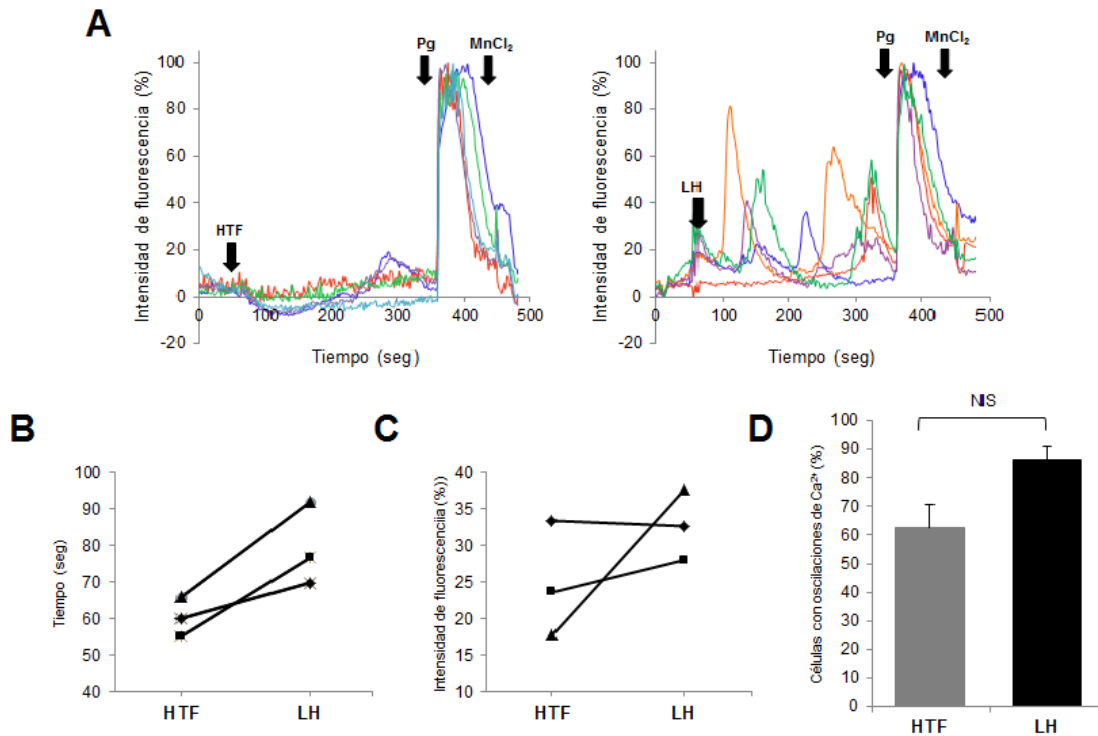


Figura 5.7. Efecto de la LH sobre las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 2 h. (A) Trazos representativos de intensidad de fluorescencia de cinco células después de la adición de HTF (control) o LH (1000 ng/mL). (B) Duración y (C) Amplitud promedio de las oscilaciones de Ca^{2+} después de la adición de HTF o LH. (D) Porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} después de ser estimuladas con HTF o LH; NS: no significativo estadísticamente (n=3; HTF: 41 espermatozoides, LH: 48 espermatozoides).

Por último, evaluamos el efecto de la LH sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante 4 h. En la figura 5.8.A se muestran trazos representativos de 5 células estimuladas con HTF o LH, donde se muestra que LH es capaz de inducir una respuesta estimulante en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Al analizar los efectos sobre la duración y amplitud de las oscilaciones, en la Figura 5.8.B se muestra que LH aumentó de forma significativa la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} , mientras que la amplitud aumentó en la mayoría de los experimentos excepto en uno (Figura 5.8.C). También

se evaluó el porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} , pero no se observaron cambios (Figura 5.8.D).

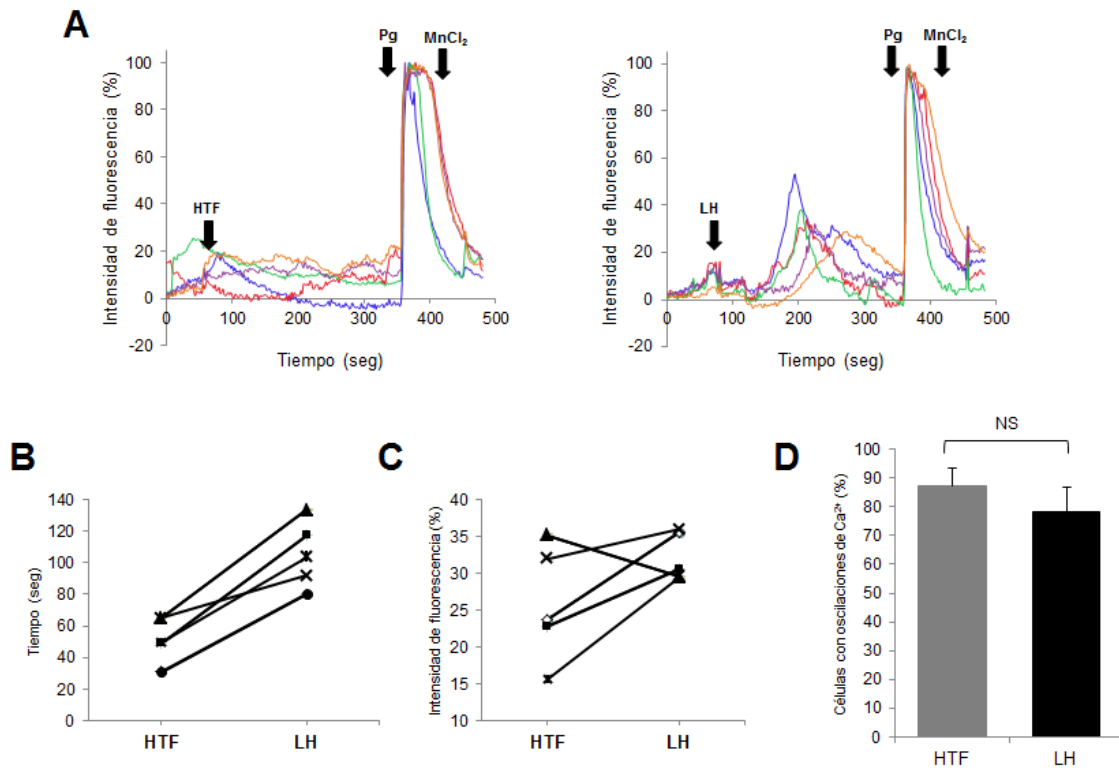


Figura 5.8. La LH incrementó la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h. (A) Trazos representativos de intensidad de fluorescencia de cinco células después de la adición de HTF (control) o LH (1000 ng/mL). (B) Duración ($p < 0.05$, HTF vs LH) y (C) Amplitud promedio de las oscilaciones de Ca^{2+} después de la adición de HTF o LH. (D) Porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} después de ser estimuladas con HTF o LH; NS: no significativo estadísticamente ($n=5$; HTF: 66 espermatozoides, LH: 83 espermatozoides).

5.2.3. Efecto de la LH en la concentración de AMPc del espermatozoide

La capacitación espermática se caracteriza por el incremento en la producción de AMPc, por lo que evaluamos el posible efecto de diferentes concentraciones de la LH sobre esta variable. En la Figura 5.9 se muestra que la LH estimula la producción de AMPc en las concentraciones de 250 y 500 ng/mL con respecto al control en ausencia de la hormona.

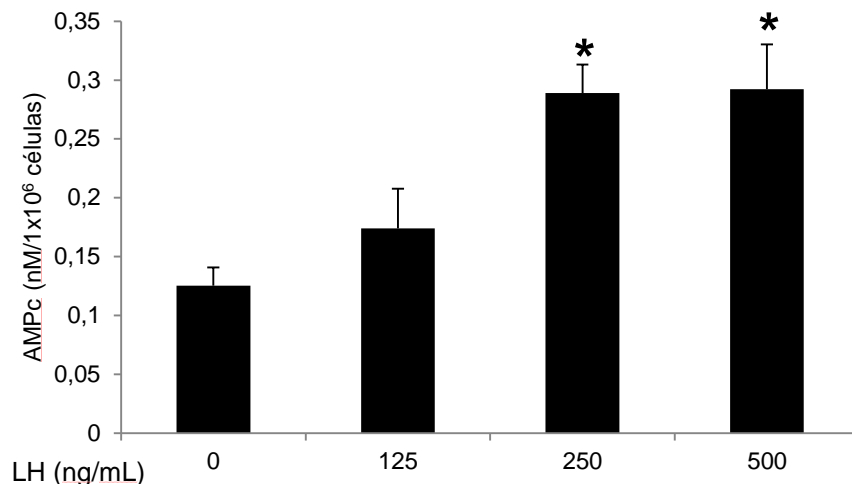


Figura 5.9. La LH aumentó la producción de AMPc en espermatozoides humanos. Los espermatozoides fueron incubados durante 1 h en HTF en presencia o ausencia de LH y se cuantificó el AMPc (n=6). (*) $p < 0.05$ vs LH (0 ng/mL).

5.2.4. Efecto de la LH sobre la fosforilación de tirosinas en el espermatozoide

En la Figura 5.10.A se muestra que en condiciones capacitantes aumenta la fosforilación en tirosinas de dos proteínas espermáticas de aproximadamente 80 y 105 kDa, tal y como se ha descrito anteriormente (88, 89). La adición de LH incrementó la fosforilación en tirosinas de estas proteínas de forma dependiente de la concentración de la hormona, observándose un efecto máximo a 500 ng/mL de LH, que disminuye cuando los espermatozoides se incubaron a concentraciones mayores. Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de LH en función del tiempo. En la Figura 5.10.B se observa que la fosforilación de tirosinas aumenta consistentemente con 500 y 1000 ng/mL de LH, la cual es detectable desde el tiempo más corto de incubación (0.5 h) y persiste a lo largo del tiempo. Este efecto es reproducible, ya que la LH a 500 y 1000 ng/mL incrementó la fosforilación de tirosinas en muestras de espermatozoides de 9 donantes diferentes (Figura 5.10.C).

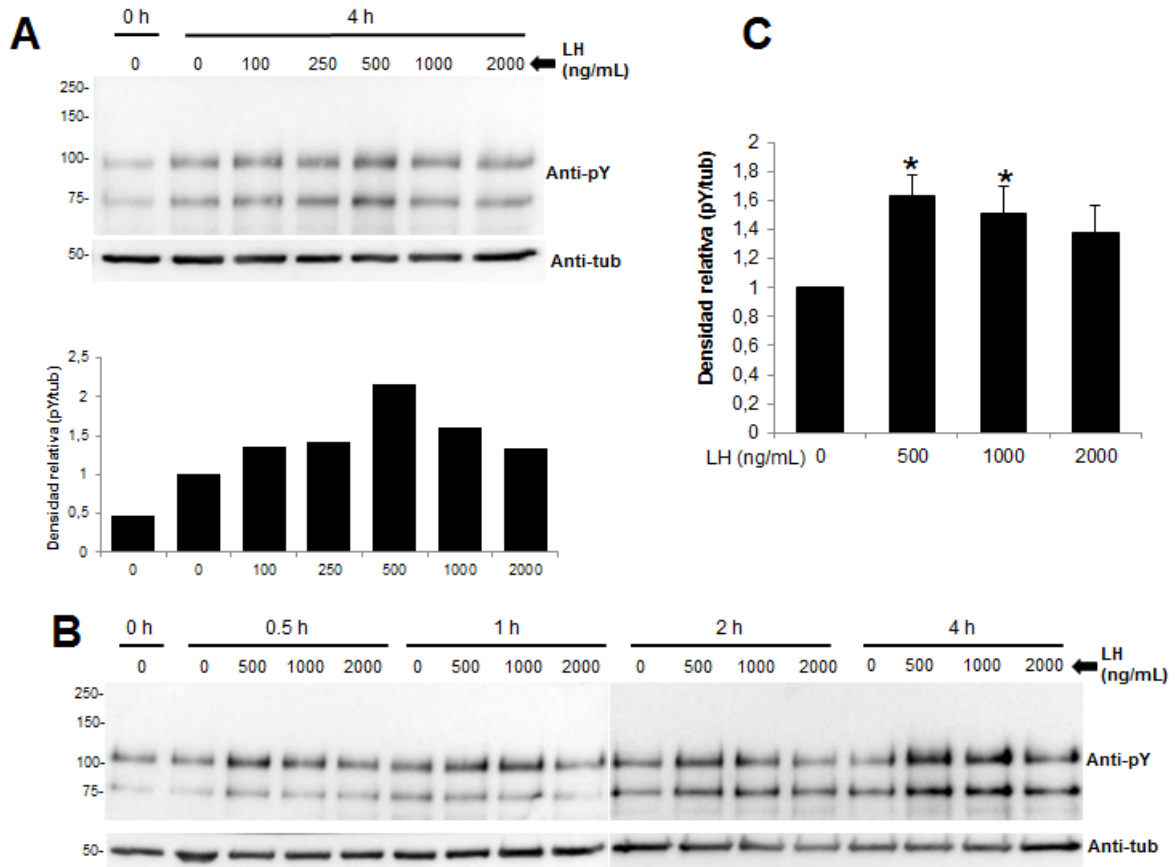


Figura 5.10. La LH aumentó la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. (A) Curva de dosis respuesta a LH después de 4 h de incubación, acompañada de su análisis densitométrico de las intensidades (pY/tub); Anti-pY: anti-fosfotirosinas y Anti-tub: anti- β -tubulina. (B) Curva de tiempo y concentración en presencia de LH. (C) Análisis densitométrico del efecto de LH a 500, 1000 y 2000 ng/mL a 4 h sobre la fosforilación de tirosinas en espermatozoides humanos (n=9). (*) $p < 0.05$ vs LH (0 ng/mL).

5.2.5. Efecto de la LH sobre la movilidad espermática

Con la finalidad de determinar si la LH tiene efectos sobre la movilidad, iniciamos los estudios evaluando cambios de movilidad al microscopio siguiendo los criterios de la O.M.S. (78). En la Figura 5.11 se muestra que en todas las concentraciones de LH estudiadas hay una disminución de la movilidad rápida progresiva. Adicionalmente se observa que para la concentración de 1000 ng/mL de LH incrementó la movilidad lenta progresiva. Estos resultados sugirieron que la LH es capaz de modular la

movilidad espermática, promoviendo la disminución de la movilidad rápida progresiva, lo cual está asociado con la capacitación.

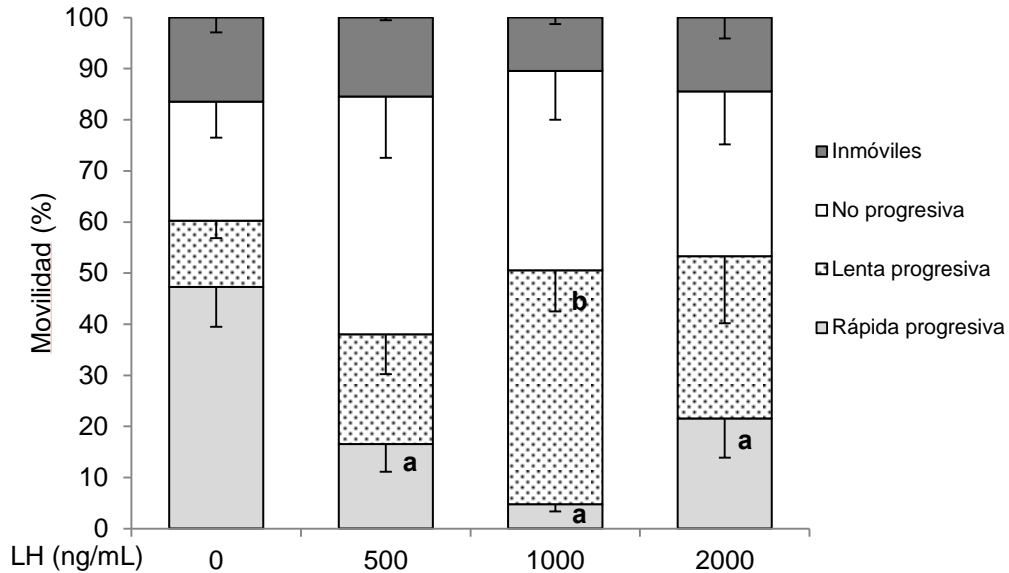


Figura 5.11. La LH modificó el patrón de movilidad espermática. Los espermatozoides se incubaron en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de LH durante 4 h y los tipos de movilidad se registraron de acuerdo a los criterios establecidos por la O.M.S. (78) (n=4). (a) $p < 0.05$ vs Rápida progresiva de LH (0 ng/mL); (b) $p < 0.05$ vs Lenta progresiva de LH (0 ng/mL).

Para tener una evaluación cuantitativa de los efectos de la hormona, se analizaron los cambios en movilidad mediante un sistema automatizado CASA. En la tabla 5.1 se muestran los valores promedio obtenidos para las diferentes variables cinéticas de movilidad espermática, donde se observan aumentos significativos para VCL, ALH y VAP debidos al tratamiento con LH. Cabe mencionar que los dos primeros parámetros se utilizaron para determinar el porcentaje de células hiperactivadas.

Tabla 5.1. Valores de variables cinéticas de la movilidad espermática evaluados por CASA después de 4 h de incubación con LH.

	LH (ng/mL)			
	0	500	1000	2000
VCL ($\mu\text{m/s}$)	100.97 \pm 3.61	108.8 \pm 4.77 (*)	109.85 \pm 5.33 (*)	106.61 \pm 5.60
VSL ($\mu\text{m/s}$)	42.85 \pm 2.39	44.11 \pm 2.53	45.25 \pm 3.72	44.2 \pm 3.36
VAP ($\mu\text{m/s}$)	59.57 \pm 1.83	61.8 \pm 2.10 (*)	63.82 \pm 3.40	62.2 \pm 3.07
LIN (%)	44.11 \pm 2.17	42.11 \pm 2.44	42.78 \pm 2.91	42.55 \pm 2.73
STR (%)	70.89 \pm 2.43	69.9 \pm 2.46	69.55 \pm 3.19	69.13 \pm 3.19
WOB (%)	60.91 \pm 1.30	59.03 \pm 1.47	60.33 \pm 1.34	60.35 \pm 1.22
ALH (μm)	2.53 \pm 0.08	2.71 \pm 0.13	2.67 \pm 0.08 (*)	2.59 \pm 0.09
BCF (Hz)	13.63 \pm 0.41	13.67 \pm 0.51	14.13 \pm 0.60	14.06 \pm 0.64

Los valores están presentados como media \pm EE, n=7, (*) $p < 0.05$ vs control (LH, 0 ng/mL).

Para corroborar la consistencia de los efectos descritos en las variables cinéticas, en la Figura 5.12.A se muestran los valores obtenidos para cada experimento (n=7) de los parámetros cinéticos que mostraron diferencias significativas, comprobándose que el aumento descrito se observa en la mayoría de los experimentos realizados. Por lo tanto, se estimó la incidencia de hiperactivación, observándose que la LH incrementó el porcentaje de células hiperactivadas a las concentraciones de 500 y 1000 ng/mL (Figura 5.12.B).

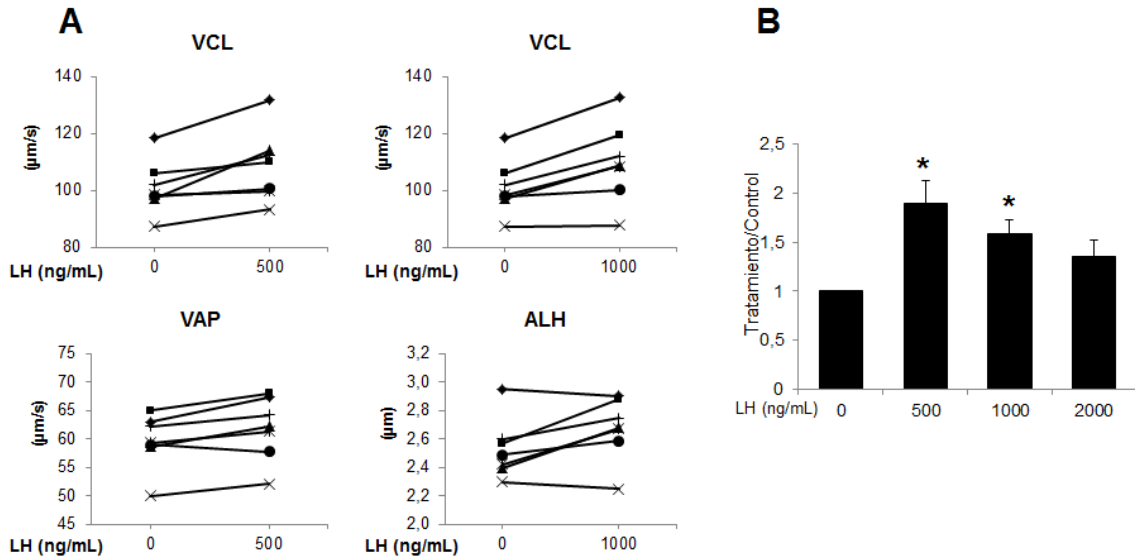


Figura 5.12. La LH incrementó algunos parámetros cinéticos de movilidad y la hiperactivación. (A) Valores promedio de los parámetros cinéticos en ausencia y presencia de LH para cada experimento (n=7). Solo se muestran los parámetros cinéticos que mostraron diferencias significativas después del tratamiento (ver Tabla 5.1). (B) Efecto de la LH sobre la proporción de espermatozoides hiperactivados (n=7). (*) $p < 0.05$ vs LH (0 ng/mL).

5.2.6. Efecto de la LH sobre la reacción acrosomal

Solamente los espermatozoides capacitados pueden experimentar la reacción acrosomal (18), por lo que decidimos evaluar el posible efecto de la LH sobre esta variable. En la Figura 5.13 se observa que la reacción acrosomal espontánea y la inducida con ionóforo de calcio incrementan de manera significativa como consecuencia de la capacitación. Sin embargo, la LH no tuvo efecto sobre la reacción acrosomal espontánea ni la inducida con ionóforo de calcio con ninguna de las concentraciones evaluadas.

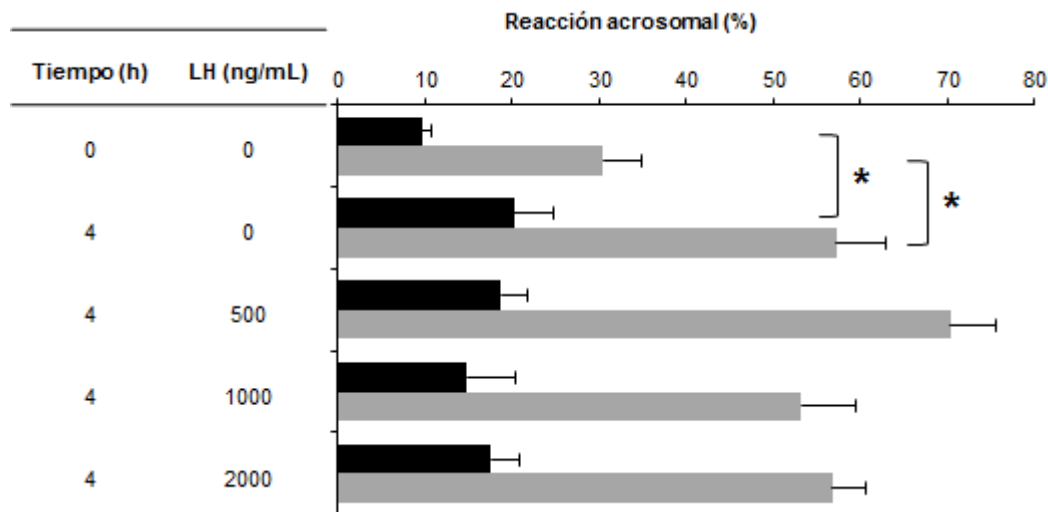


Figura 5.13. La LH no tuvo efecto sobre la reacción acrosomal. Los espermatozoides fueron incubados con diferentes concentraciones de LH durante 4 h y se evaluó el estatus acrosomal. Barras negras: Reacción acrosomal espontánea. Barras grises: Reacción acrosomal inducida por ionóforo de calcio (A23187) (n=5). (*) $p < 0.05$. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con LH y el control (0 ng/mL) a 4 h.

5.3. Efectos de la hCG sobre variables de la función espermática

Debido a que hCG y LH se unen al mismo receptor, se evaluó el posible papel de la hCG sobre algunas variables de la función espermática. Para ello, se emplearon concentraciones de hCG equimolares de LH utilizadas en el presente estudio.

5.3.1. Efecto de la hCG sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide

Para evaluar el posible efecto de la hCG sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante 4 h, se empleó la técnica de célula única. En la Figura 5.14.A se muestra la secuencia de imágenes de $[Ca^{2+}]_i$ del control y con hCG a las concentraciones de 612, 1224 y 2448 ng/mL (Figura 5.14.B, C, D), equivalentes en concentraciones molares a 500, 1000 y 2000 ng/mL de LH respectivamente. En la secuencia control se observan cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ considerados como basales. En cambio, con las diferentes concentraciones de hCG se observó que la hormona modifica el patrón de oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$.

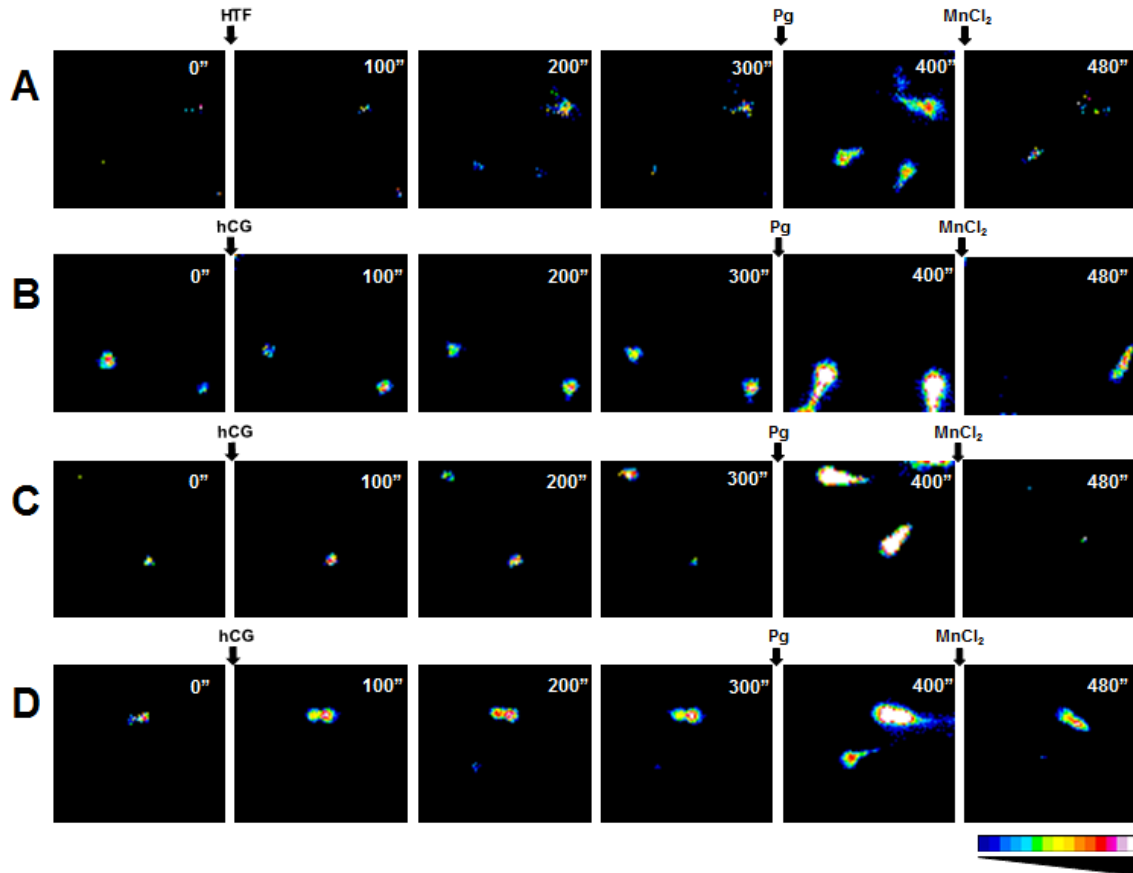


Figura 5.14. Secuencia de imágenes de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados durante 4 h y estimulados con hCG. Los espermatozoides se registraron durante un tiempo total de 480 seg. Al segundo 60, se añadió HTF/hCG a los espermatozoides y al segundo 360 se añadió Pg como control positivo, seguido de $MnCl_2$ que se utilizó para apagar la fluorescencia. (A) Espermatozoides estimulados con HTF. (B) Espermatozoides estimulados con hCG (612 ng/mL). (C) Espermatozoides estimulados con hCG (1224 ng/mL). (D) Espermatozoides estimulados con hCG (2448 ng/mL).

Posteriormente evaluamos los trazos individuales de los espermatozoides. En la Figura 5.15.A se puede observar que hCG fue capaz de inducir cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en comparación con el control, ya que la adición de la hormona indujo una respuesta estimulante inmediata en la $[Ca^{2+}]_i$ con todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, al analizar el porcentaje de las células con oscilaciones de Ca^{2+} , no se observaron diferencias (Figura 5.15.B). Al analizar los trazos individuales de los espermatozoides para la condición control y los tratamientos con hCG de dos experimentos independientes, observamos que la hCG no afectó la

amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} de manera consistente (Figura 5.15.C), pero sí la duración de las mismas (Figura 5.15.D).

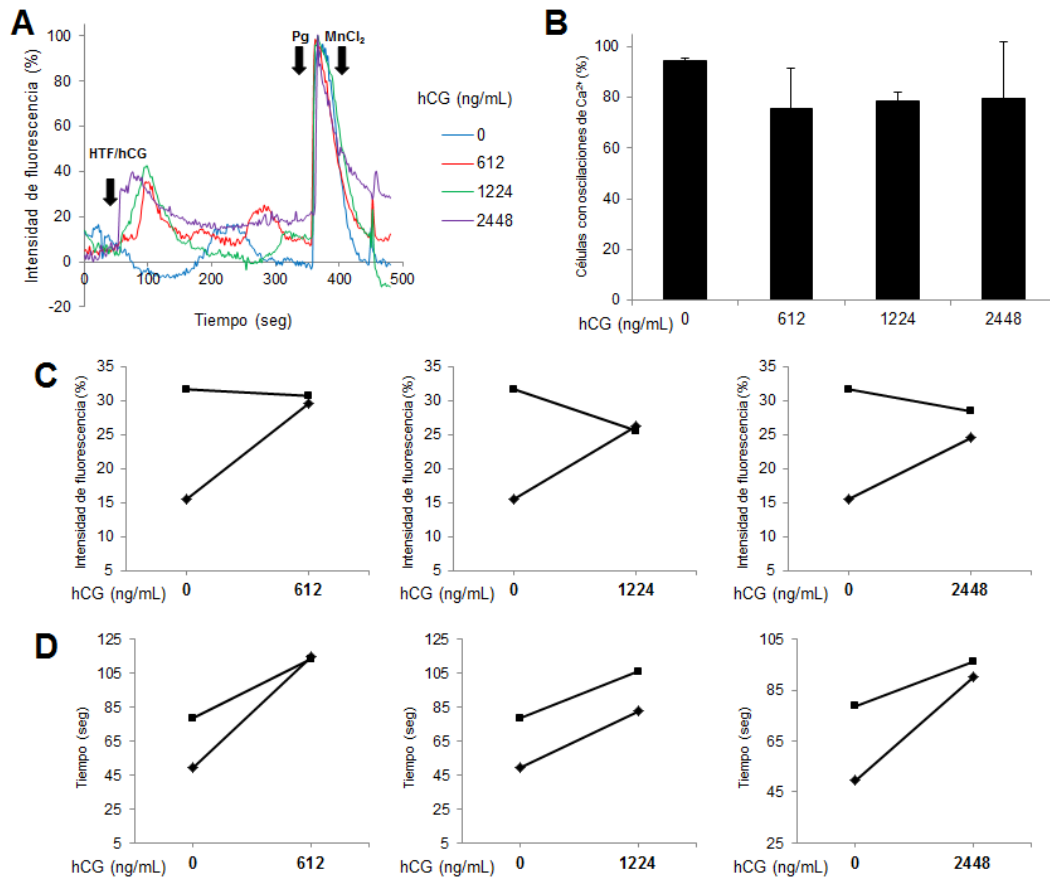


Figura 5.15. Efecto de la hCG sobre las oscilaciones de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados durante 4 h. (A) Trazos de intensidad de fluorescencia de cuatro células después de la adición de HTF sólo o con diferentes concentraciones de hCG. (B) Porcentaje de células con oscilaciones de Ca^{2+} después de ser estimuladas con HTF o hCG (Media \pm DE). (C) Amplitud y (D) Duración de las oscilaciones de Ca^{2+} después de la adición de HTF o hCG (n=2; HTF: 39 espermatozoides, hCG-612: 37 espermatozoides, hCG-1224: 37 espermatozoides, hCG-2448: 36 espermatozoides).

5.3.2. Efecto de la hCG sobre la fosforilación de tirosinas en el espermatozoide

En la Figura 5.16 se muestra que al comparar la fosforilación en tirosinas del control 4 h con el control 0 h se produjo un aumento como consecuencia de la capacitación.

Sin embargo, ninguna de las concentraciones de hCG evaluadas tuvo efecto sobre esta variable.

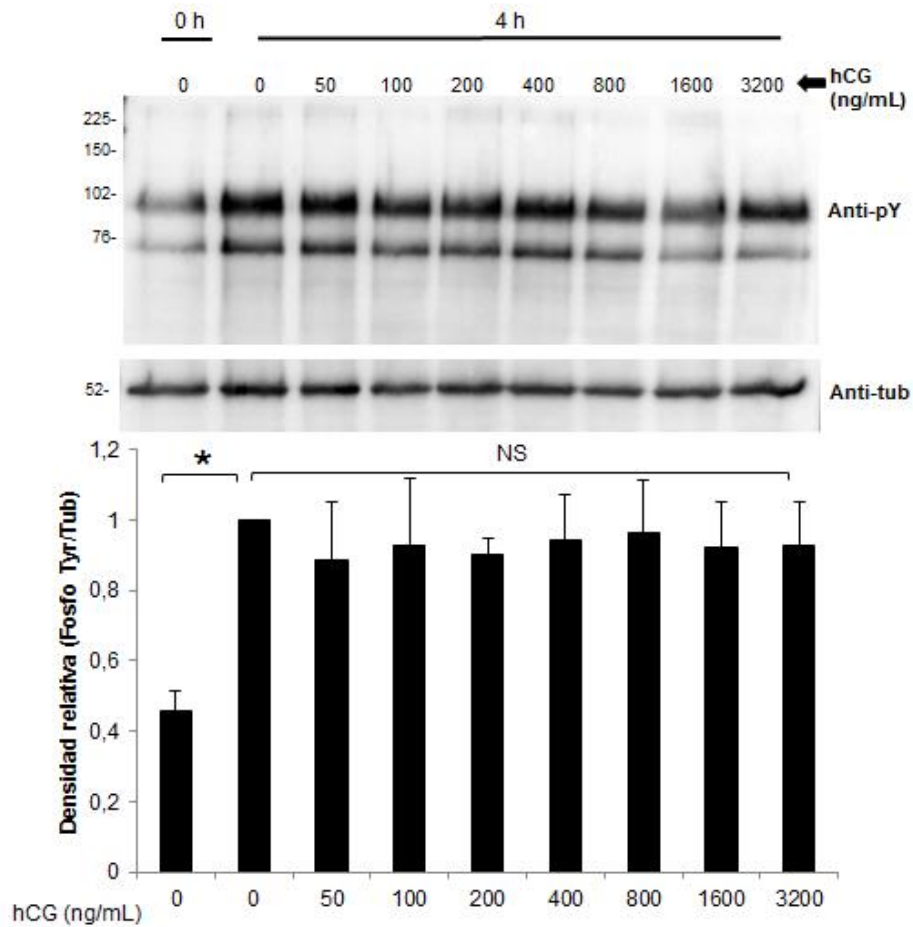


Figura 5.16. La hCG no alteró la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. Curva de dosis respuesta a hCG después de 4 h de incubación, acompañada de su análisis densitométrico de las intensidades (pY/tub), Anti-pY: anti-fosfotirosinas y Anti-tub: anti- β -tubulina. (n=3). (*) $p < 0.05$ vs control (hCG, 0 ng/mL, 0 h). NS: no significativo estadísticamente.

5.3.3. Efecto de la hCG sobre la movilidad espermática

Los cambios en la movilidad espermática se analizaron mediante CASA, luego de incubar con diferentes concentraciones de hCG durante 4 h de capacitación. En la Tabla 5.2 se muestran los valores obtenidos para las diferentes variables cinéticas de movilidad espermática, donde no se observaron cambios. Adicionalmente, se

calculó el porcentaje de células hiperactivadas, en el cual tampoco se observó efecto de la hCG (Figura 5.17).

Tabla 5.2. Valores de variables cinéticas de la movilidad espermática evaluados por CASA después de 4 h de incubación con hCG.

	hCG (ng/mL)			
	0	612	1224	2447
VCL ($\mu\text{m/s}$)	107.90 \pm 6.41	107.47 \pm 4.03	106.36 \pm 4.63	107.34 \pm 7.66
VSL ($\mu\text{m/s}$)	49.90 \pm 3.98	50.45 \pm 2.68	49.80 \pm 2.46	50.19 \pm 4.71
VAP ($\mu\text{m/s}$)	64.70 \pm 4.07	64.51 \pm 2.18	64.20 \pm 2.24	65.14 \pm 4.11
LIN (%)	46.9 \pm 1.29	47 \pm 2.00	46.8 \pm 2.53	46.3 \pm 2.5
STR (%)	75.1 \pm 1.33	75.4 \pm 2.52	74.5 \pm 2.88	73.3 \pm 3.82
WOB (%)	61.4 \pm 0.56	61.1 \pm 0.70	61.6 \pm 1.08	61.7 \pm 0.80
ALH (μm)	2.65 \pm 0.15	2.63 \pm 0.11	2.59 \pm 0.11	2.64 \pm 0.19
BCF (Hz)	14.32 \pm 0.43	14.37 \pm 1.10	14.33 \pm 0.75	14.03 \pm 0.89

Los valores están presentados como Media \pm EE, n=3. No se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas de hCG y el control en ausencia de la hormona.

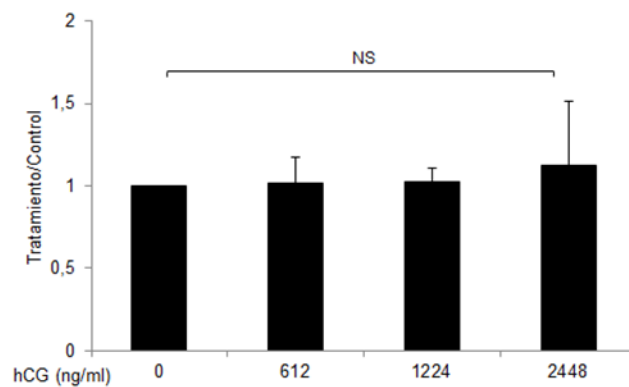


Figura 5.17. La hCG no tuvo un efecto sobre la hiperactivación. Proporción de espermatozoides hiperactivados después de 4 h de incubación con hCG (n=3). NS: no significativo estadísticamente.

5.3.4. Efecto de la hCG en la concentración de AMPc en cultivo primario de placenta

En vista de que en los experimentos anteriores con hCG no se observaron efectos claros sobre el espermatozoide, decidimos realizar un control para corroborar la actividad biológica de la hormona. Para ello, se evaluó su efecto sobre un cultivo primario de células de placenta, donde se ha descrito que la hormona incrementa la producción de AMPc (82). En la Figura 5.18 se muestra que la hCG empleada en nuestros estudios estimuló la concentración de AMPc, sugiriendo que la hormona era biológicamente activa.

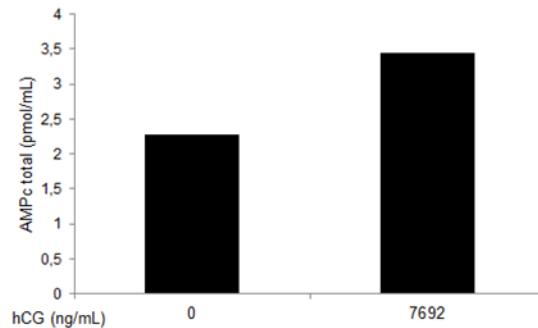


Figura 5.18. Efecto de la hCG sobre la concentración de AMPc en células de placenta humana. Las células de placenta se estimularon con 7692 ng/mL de hCG durante 1h (n=1).

6. DISCUSIÓN

Investigaciones previas indican que la LH puede estar presente en diversas secreciones del tracto reproductor femenino, tales como el moco cervical (72) y el fluido folicular (73, 74). La hipófisis es la mayor fuente de producción de LH, pero esta hormona también podría producirse localmente por tejidos del tracto reproductivo femenino. De hecho, hay evidencias de la producción extrahipofisiaria de LH en el ovario de humano (90). Por lo tanto, es plausible la coincidencia espacio-temporal del espermatozoide humano con la LH durante su recorrido a lo largo del tracto reproductor femenino en el transcurso de la ventana fértil. Por otra parte, nuestros resultados indican la presencia del LH/hCGr en espermatozoides humanos. El LH/hCGr es una glicoproteína con siete pasos transmembranales, el cual está asociado a proteínas G. Está altamente expresado en ovario, pero también se ha descrito su presencia en varios tejidos no gonadales de la mujer como el útero, la placenta, las membranas fetales y la decidua (91). Previamente se ha descrito en el espermatozoide la presencia de una variante del LH/hCGr con una masa molecular de 80 kDa, localizada en cabeza, pieza media y flagelo (76). Sin embargo, nuestros resultados indican la existencia de 2 variantes de aproximadamente 53 y 48 kDa, similares a las detectadas en el control positivo de células de cérvix, con una presencia consistente en pieza media y flagelo, lo cual sugiere que la LH podría estar involucrada en la regulación de la movilidad espermática. De manera interesante, los análisis de movilidad espermática por CASA indicaron que la LH aumentó las variables cinéticas VCL, ALH y VAP. Estos cambios están relacionados con la hiperactivación, la cual es una subpoblación de células con una movilidad característica asociada a la capacitación (92).

Para estudiar los posibles efectos de la LH sobre diferentes variables relacionadas con la capacitación consideramos los eventos tempranos y tardíos que ocurren durante este proceso (93), por lo que el tiempo de incubación con la hormona se ajustó en cada caso. Además, las concentraciones de hormona analizadas se escogieron de acuerdo a los valores de referencia reportados en suero (79) y un

poco más altas, debido a la variabilidad en las concentraciones máximas observadas durante el pico de LH en mujeres.

Los resultados presentados en este trabajo indican que los efectos de la LH sobre la función espermática son más notables en las concentraciones de 500-1000 ng/mL, mismas que se asemejan a las concentraciones séricas descritas para las mujeres durante el pico preovulatorio de la LH (79), lo que sugiere que la LH podría modular la función espermática durante la ventana fértil. Estas concentraciones son biológicamente funcionales, ya que experimentos *in vitro* con células de la granulosa han demostrado que 1000 ng/mL de LH induce la producción de AMPc y la secreción de Pg (94). Sin embargo, es posible que se requieran concentraciones más bajas de la hormona *in vivo*, donde otras moléculas existentes en el tracto reproductor femenino podrían potenciar los efectos de la LH, como se ha descrito en células de la granulosa de rata donde el E2 potencia la capacidad de LH de inducir la producción del activador de plasminógeno (95). Por otra parte, en la mayoría de los ensayos en los que se empleó la concentración de 2000 ng/mL de LH no se observó un efecto consistente sobre el espermatozoide, excepto cuando se evaluó la $[Ca^{2+}]_i$ por espectrofluorimetría y en la movilidad evaluada mediante observación directa al microscopio. Esto podría estar asociado a la sensibilidad de las técnicas utilizadas. Por otro lado, si bien los nuestros resultados no permiten definir la vía por la que la LH induce sus efectos sobre el espermatozoide, si están mediados por el LH/hCGr es posible que la disminución del efecto a 2000 ng/mL sobre las diferentes variables analizadas esté asociado a una desensibilización del receptor a concentraciones superiores a las que se han observado en la mujer. Este fenómeno ya se ha descrito en células testiculares de rata, donde la exposición a altas concentraciones de hCG induce una pérdida de LH/hCGr y mantiene el AMPc en concentraciones basales (96).

Los resultados indican que la LH es capaz de modular algunas variables de la función espermática asociadas con la capacitación, lo que abre la puerta al estudio de nuevos mecanismos de acción hormonal que regulen este proceso. Interesantemente, la LH estimuló la concentración de AMPc, la $[Ca^{2+}]_i$, la

fosforilación en tirosinas y cambios en el patrón de movilidad espermática, pero no tuvo efectos sobre la reacción acrosomal, sugiriendo que podría activar vías específicas en este tipo celular. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ es indispensable para actuar como segundo mensajero en diferentes vías implicadas en la capacitación espermática, tales como la movilidad, la quimiotaxis y la reacción acrosomal (97). Los resultados aquí mostrados indican que la LH moduló las oscilaciones de Ca^{2+} incrementando de manera consistente la duración de las mismas, si bien estas oscilaciones no fueron de la misma magnitud de las observadas con Pg. Es posible que proteínas G acopladas al LH/hCGr regulen directamente canales iónicos en la membrana plasmática, alterando su permeabilidad iónica (98).

El mecanismo de acción de la LH en el espermatozoide se desconoce. Sin embargo, en células somáticas las gonadotropinas se unen a este receptor promoviendo la activación de dos vías de señalización: una que actúa mediante la proteína G estimulante (Gs), la cual activa a la adenilato ciclasa transmembranal (ACtm) que a su vez induce un incremento en el AMPc y activa PKA (ACtm/AMPc/PKA); y la otra donde las hormonas estimulan a la proteína Gq, la cual induce la activación de la fosfolipasa C, y como consecuencia hay un incremento de inositol fosfato y activa la proteína cinasa C (PLC/IP/PKC) (65). Ambas vías de señalización están implicadas en la capacitación espermática (99-101). La capacitación está asociada con el incremento en la fosforilación de tirosinas y algunos parámetros cinéticos, los cuales son regulados por la vía de AMPc/PKA (100). Por consiguiente, la LH podría estimular esta vía para desencadenar algunos de los efectos aquí descritos, pero la dilucidación de la vía de señalización responsable de dichos efectos debe ser objeto de futuras investigaciones.

Estudios previos indican que la adenilato ciclasa soluble (ACs) presente en el espermatozoide es un regulador fundamental de la capacitación. En cambio, la presencia y funcionalidad de la ACtm en este proceso ha sido motivo de controversia (revisado en (102)). En espermatozoide humano se ha descrito la participación de la ACtm durante la quimiotaxis dependiente de Pg, ya que es capaz de cambiar su orientación en un campo mediante la activación de la vía ACtm/AMPc/PKA (103). Otro grupo de receptores acoplados a proteína G en el

espermatozoide humano son los odorizantes G_{olf} que participan en la quimiotaxis mediante la estimulación de la ACtm que potencia el batido flagelar y la dirección del espermatozoide hacia la fuente de quimioatrayente (104, 105). Por otra parte, un estudio reciente en espermatozoides maduros de cabra demostró que una glicoproteína del suero es capaz de estimular la actividad de la ACtm, aumentando la concentración intracelular de AMPc y potenciando la movilidad progresiva (106).

Adicionalmente, quisimos comparar los efectos de LH y hCG sobre el espermatozoide, ya que diversos estudios han utilizado la LH y la hCG de manera indistinta en diferentes modelos (76). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que estas hormonas desencadenan diferentes cascadas de eventos después de la unión al receptor (66). Nuestros resultados indican que estas hormonas actúan de forma diferente en el espermatozoide, ya que la hCG sólo mostró efectos sutiles sobre la $[Ca^{2+}]_i$ a las concentraciones utilizadas en este estudio. Por lo tanto, a pesar de unirse al mismo receptor, los efectos de estas hormonas deberían estudiarse de forma independiente.

Este estudio demuestra por primera vez efectos directos de la LH sobre variables espermáticas relevantes para su capacidad de fecundar, por lo que debería ser considerada como uno de los factores reguladores de la interacción de gametos en humano.

7. CONCLUSIONES

- La LH estimuló la producción de AMPc, el influjo de calcio, la fosforilación de tirosina de las proteínas y la movilidad en espermatozoides humanos, pero no tuvo efecto sobre la reacción acrosomal.
- A pesar de unirse al mismo receptor, la hCG no reprodujo lo efectos observados con la LH en espermatozoides, modulando sólo el influjo de calcio.
- La LH podría desempeñar un papel relevante en la capacitación del espermatozoide durante la ventana fértil, ayudando en la sincronización de los eventos que culminan con la fecundación.
- Los resultados podrían ser relevantes para el manejo de la reproducción humana, tanto natural como asistida.

8. LITERATURA CITADA

1. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., and Trevino, C. L. (2011) Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa, *Physiol Rev* 91, 1305-1355.
2. Clement, P., and Giuliano, F. (2015) Anatomy and physiology of genital organs - men, *Handb Clin Neurol* 130, 19-37.
3. Rizzo, D. C. (2015). Fundamentals of Anatomy and Physiology. Boston: Ed. CENGAGE Learning, 4th. ed, 454-460.
4. Hess, R. A., and Renato de Franca, L. (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium, *Adv Exp Med Biol* 636, 1-15.
5. Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2009) An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 245-263.
6. Gadella, B. M., and Luna, C. (2014) Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface, *Theriogenology* 81, 74-84.
7. Halvorson, L. M., and DeCherney, A. H. (1996) Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine, *Fertil Steril* 65, 459-469.
8. Hrabovszky, E., and Liposits, Z. (2013) Afferent neuronal control of type-I gonadotropin releasing hormone neurons in the human, *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 130.
9. Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., and Calvete, J. J. (2011) Seminal plasma proteins: what role do they play?, *Am J Reprod Immunol* 66 Suppl 1, 11-22.
10. Adeoya-Osiguwa, S. A., and Fraser, L. R. (1996) Evidence for Ca(2+)-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm, *Mol Reprod Dev* 44, 111-120.
11. Roberts, K. P., Ensrud-Bowlin, K. M., Piehl, L. B., Parent, K. R., Bernhardt, M. L., and Hamilton, D. W. (2008) Association of the protein D and protein E forms of rat CRISP1 with epididymal sperm, *Biol Reprod* 79, 1046-1053.
12. Chiu, P. C., Chung, M. K., Tsang, H. Y., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K. F., and Yeung, W. S. (2005) Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa, *J Biol Chem* 280, 25580-25589.
13. Ríos, E. A., Ruiz, AC, García, DA, Rubio, PJPZ, Tobón, AR y García, AR. (2010) Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide., *ContactoS* 74, 5-11.
14. Sullivan, R., and Saez, F. (2013) Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology, *Reproduction* 146, R21-35.
15. Buschow, S. I., van Balkom, B. W., Aalberts, M., Heck, A. J., Wauben, M., and Stoorvogel, W. (2010) MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis, *Immunol Cell Biol* 88, 851-856.
16. Schuffner, A. A., Bastiaan, H. S., Duran, H. E., Lin, Z. Y., Morshedi, M., Franken, D. R., and Oehninger, S. (2002) Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid, *Mol Hum Reprod* 8, 722-727.
17. Sobotta, W. 2008. Histología. Madrid: Ed. Médica Panamericana S. A., 2da. ed, 484 p.
18. Olivera, M. R., T.; Tarazona, A.; Giraldo, C. (2006) El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 427-436.

19. Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., and Diekman, A. B. (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity, *J Reprod Immunol* 53, 133-150.
20. Wolf, D. E., Hagopian, S. S., and Ishijima, S. (1986) Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse, *J Cell Biol* 102, 1372-1377.
21. Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., and Brewis, I. A. (2008) Sperm head membrane reorganisation during capacitation, *Int J Dev Biol* 52, 473-480.
22. Davis, B. K. (1981) Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7560-7564.
23. Martinez, P., and Morros, A. (1996) Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation, *Front Biosci* 1, d103-117.
24. Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. J., and Clapham, D. E. (2012) The control of male fertility by spermatozoan ion channels, *Annu Rev Physiol* 74, 453-475.
25. Bonaccorsi, L., Luconi, M., Forti, G., and Baldi, E. (1995) Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm, *FEBS Lett* 364, 83-86.
26. Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., and Levin, L. R. (2003) Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate, *J Biol Chem* 278, 15922-15926.
27. Darszon, A., Trevino, C. L., Wood, C., Galindo, B., Rodriguez-Miranda, E., Acevedo, J. J., Hernandez-Gonzalez, E. O., Beltran, C., Martinez-Lopez, P., and Nishigaki, T. (2007) Ion channels in sperm motility and capacitation, *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 229-244.
28. Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., and Florman, H. M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6757-6762.
29. Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., Levin, L. R., Williams, C. J., Buck, J., and Moss, S. B. (2005) The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization, *Dev Cell* 9, 249-259.
30. Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., Gossen, J. A., Esposito, G., van Duin, M., and Conti, M. (2006) Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization, *Dev Biol* 296, 353-362.
31. Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G. S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation, *Development* 121, 1129-1137.
32. Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., and Visconti, P. E. (2010) Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors, *J Biol Chem* 285, 7977-7985.
33. Baker, M. A., Hetherington, L., and Aitken, R. J. (2006) Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa, *J Cell Sci* 119, 3182-3192.
34. Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., and Visconti, P. E. (2007) Signalling pathways involved in sperm capacitation, *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 245-259.
35. Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., and Clapham, D. E. (2007) All four CatSper ion channel proteins are

- required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1219-1223.
36. Chang, H., Kim, B. J., Kim, Y. S., Suarez, S. S., and Wu, M. (2013) Different migration patterns of sea urchin and mouse sperm revealed by a microfluidic chemotaxis device, *PLoS One* 8, e60587.
 37. Brucker, C., and Lipford, G. B. (1995) The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update, *Hum Reprod Update* 1, 51-62.
 38. Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization., In: *Knobil E. et al. (ed) Physiology of Reproduction. New York: Raven Press Ltd*, 189-317.
 39. Suarez, S. S. (2008) Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct, *Int J Dev Biol* 52, 455-462.
 40. Gerton, G. L. (2002) Function of the Sperm Acrosome., In: *Hardy DM (ed.) Fertilization. San Diego: Academic Press*; 265-302.
 41. Calogero, A. E., Burrello, N., Barone, N., Palermo, I., Grasso, U., and D'Agata, R. (2000) Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action, *Hum Reprod* 15 Suppl 1, 28-45.
 42. Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., Gonzalez-Gonzalez, M. E., Galicia-Chavarria, M., Larrea, F., and Gerton, G. L. (2006) Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function, *Biol Reprod* 74, 760-768.
 43. Mumford, S. L., Steiner, A. Z., Pollack, A. Z., Perkins, N. J., Filiberto, A. C., Albert, P. S., Mattison, D. R., Wactawski-Wende, J., and Schisterman, E. F. (2012) The utility of menstrual cycle length as an indicator of cumulative hormonal exposure, *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1871-1879.
 44. de los Santos, M. J., Garcia-Laez, V., Beltran-Torregrosa, D., Horcajadas, J. A., Martinez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Pellicer, A., and Labarta, E. (2012) Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles, *Hum Reprod* 27, 1596-1605.
 45. Astle, S., Slater, D. M., and Thornton, S. (2003) The involvement of progesterone in the onset of human labour, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108, 177-181.
 46. Korach, K. S. (1981) Selected biochemical actions of ovarian hormones, *Environ Health Perspect* 38, 39-45.
 47. Acconcia, F., and Kumar, R. (2006) Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors, *Cancer letters* 238, 1-14.
 48. Coleman, K. M., and Smith, C. L. (2001) Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors, *Front Biosci* 6, D1379-1391.
 49. Blackmore, P. F. (1993) Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm, *Cellular signalling* 5, 531-538.
 50. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm, *Nature* 471, 387-391.
 51. Strunker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm, *Nature* 471, 382-386.
 52. Mannowetz, N., Miller, M. R., and Lishko, P. V. (2017) Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5743-5748.

53. Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., and Lishko, P. V. (2016) Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone, *Science* 352, 555-559.
54. de Lamirande, E., Harakat, A., and Gagnon, C. (1998) Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion, *J Androl* 19, 215-225.
55. Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., and Giojalas, L. C. (2006) Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa, *Fertil Steril* 86, 745-749.
56. Uhler, M. L., Leung, A., Chan, S. Y., and Wang, C. (1992) Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction, *Fertil Steril* 58, 1191-1198.
57. Harper, C. V., Barratt, C. L., and Publicover, S. J. (2004) Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating, *J Biol Chem* 279, 46315-46325.
58. Servin-Vences, M. R., Tatsu, Y., Ando, H., Guerrero, A., Yumoto, N., Darszon, A., and Nishigaki, T. (2012) A caged progesterone analog alters intracellular Ca^{2+} and flagellar bending in human sperm, *Reproduction* 144, 101-109.
59. Francavilla, F., Romano, R., Santucci, R., Macerola, B., Ruvolo, G., and Francavilla, S. (2002) Effect of human sperm exposure to progesterone on sperm-oocyte fusion and sperm-zona pellucida binding under various experimental conditions, *Int J Androl* 25, 106-112.
60. Luconi, M., Muratori, M., Forti, G., and Baldi, E. (1999) Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects, *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1670-1678.
61. Guido, C., Perrotta, I., Panza, S., Middea, E., Avena, P., Santoro, M., Marsico, S., Imbrogno, P., Ando, S., and Aquila, S. (2011) Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ERalpha) and estrogen receptor beta (ERbeta) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility, *J Cell Physiol* 226, 3403-3412.
62. Idaomar, M., Guerin, J. F., Lornage, J., and Czyba, J. C. (1989) Stimulation of motility and energy metabolism of spermatozoa from asthenozoospermic patients by 17 beta-estradiol, *Arch Androl* 22, 197-202.
63. Ezcurra, D., and Humaidan, P. (2014) A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology, *Reprod Biol Endocrinol* 12, 95.
64. Minegishi, T., Nakamura, K., and Ibuki, Y. (1993) Structure and regulation of LH/CG receptor, *Endocrine journal* 40, 275-287.
65. Choi, J., and Smitz, J. (2014) Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference, *Mol Cell Endocrinol* 383, 203-213.
66. Casarini, L., Lispi, M., Longobardi, S., Milosa, F., La Marca, A., Tagliasacchi, D., Pignatti, E., and Simoni, M. (2012) LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling, *PLoS One* 7, e46682.
67. Ryu, K., Lee, H., Kim, S., Beauchamp, J., Tung, C. S., Isaacs, N. W., Ji, I., and Ji, T. H. (1998) Modulation of high affinity hormone binding. Human choriogonadotropin binding to the exodomain of the receptor is influenced by exoloop 2 of the receptor, *J Biol Chem* 273, 6285-6291.
68. Bukovsky, A., Indrapichate, K., Fujiwara, H., Cekanova, M., Ayala, M. E., Dominguez, R., Caudle, M. R., Wimalsena, J., Elder, R. F., Copas, P., Foster, J. S., Fernando, R. I., Henley, D. C., and Upadhyaya, N. B. (2003) Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein

- variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease, *Reprod Biol Endocrinol* 1, 46.
69. Marsh, J. M. (1975) The role of cyclic AMP in gonadal function, *Adv Cyclic Nucleotide Res* 6, 137-199.
 70. Davis, J. S., Weakland, L. L., Farese, R. V., and West, L. A. (1987) Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells, *J Biol Chem* 262, 8515-8521.
 71. Stepien, A., and Ziecik, A. J. (2002) Second messenger systems in the action of LH and oxytocin on porcine endometrial cells in vitro, *Theriogenology* 57, 2217-2227.
 72. Moreno-Escallon, B., Chappel, S., and Blasco, L. (1982) Luteinizing hormone in cervical mucus, *Fertil Steril* 37, 536-541.
 73. de los Santos, M. J., Garcia-Laez, V., Beltran, D., Labarta, E., Zuzuarregui, J. L., Alama, P., Gamiz, P., Crespo, J., Bosch, E., and Pellicer, A. (2013) The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: Is it hypoandrogenic?, *Hum Reprod* 28, 224-229.
 74. Pacella, L., Zander-Fox, D. L., Armstrong, D. T., and Lane, M. (2012) Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment, *Fertil Steril* 98, 986-994 e981-982.
 75. Lei, Z. M., Toth, P., Rao, C. V., and Pridham, D. (1993) Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes, *J Clin Endocrinol Metab* 77, 863-872.
 76. Eblen, A., Bao, S., Lei, Z. M., Nakajima, S. T., and Rao, C. V. (2001) The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm, *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2643-2648.
 77. Wettemann, R. P., and Hafs, H. D. (1970) Sperm capacitation after injection of LH or HCG in rabbits, *Proc Soc Exp Biol Med* 133, 1002-1005.
 78. World Health Organization (1999) *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed., Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, U.K. ; New York, NY.
 79. Sherman, B. M., and Korenman, S. G. (1975) Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life, *J Clin Invest* 55, 699-706.
 80. Chavez, J. C., de la Vega-Beltran, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Trevino, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., and Santi, C. M. (2013) Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization, *PLoS One* 8, e60578.
 81. Mata-Martinez, E., Jose, O., Torres-Rodriguez, P., Solis-Lopez, A., Sanchez-Tusie, A. A., Sanchez-Guevara, Y., Trevino, M. B., and Trevino, C. L. (2013) Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging, *J Vis Exp*, e50344.
 82. Olmos-Ortiz, A., Garcia-Quiroz, J., Lopez-Marure, R., Gonzalez-Curiel, I., Rivas-Santiago, B., Olivares, A., Avila, E., Barrera, D., Halhali, A., Caldino, F., Larrea, F., and Diaz, L. (2016) Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression, *J Steroid Biochem Mol Biol* 163, 173-182.
 83. Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., Cardenas, M., and Ulloa-Aguirre, A. (1996) Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone, *Mol Hum Reprod* 2, 563-571.

84. Lojun, S., Bao, S., Lei, Z. M., and Rao, C. V. (1997) Presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (hCG) receptors in human breast cell lines: implications supporting the premise that hCG protects women against breast cancer, *Biol Reprod* 57, 1202-1210.
85. Lopez-Gonzalez, I., Torres-Rodriguez, P., Sanchez-Carranza, O., Solis-Lopez, A., Santi, C. M., Darszon, A., and Trevino, C. L. (2014) Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation, *Mol Hum Reprod* 20, 619-629.
86. Patrat, C., Serres, C., and Jouannet, P. (2002) Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa, *Biol Reprod* 66, 1775-1780.
87. Kirkman-Brown, J. C., Barratt, C. L., and Publicover, S. J. (2004) Slow calcium oscillations in human spermatozoa, *Biochem J* 378, 827-832.
88. Carrera, A., Moos, J., Ning, X. P., Gerton, G. L., Tesarik, J., Kopf, G. S., and Moss, S. B. (1996) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation, *Dev Biol* 180, 284-296.
89. Lachance, C., Goupil, S., Tremblay, R. R., and Leclerc, P. (2016) The immobilization of human spermatozoa by STAT3 inhibitory compound V results from an excessive intracellular amount of reactive oxygen species, *Andrology* 4, 133-142.
90. Harvey, S., Aramburo, C., and Sanders, E. J. (2012) Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview, *Endocrine* 41, 19-30.
91. Reshef, E., Lei, Z. M., Rao, C. V., Pridham, D. D., Chegini, N., and Luborsky, J. L. (1990) The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua, *J Clin Endocrinol Metab* 70, 421-430.
92. Ariagno, J. I., Mendeluk, G. R., Furlan, M. J., Sardi, M., Chenlo, P., Curi, S. M., Pugliese, M. N., Repetto, H. E., and Cohen, M. (2016) Computer-aided sperm analysis: a useful tool to evaluate patient's response to varicocelectomy, *Asian J Androl*.
93. Visconti, P. E. (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 667-668.
94. Osteen, K. G., Anderson, L. D., Reichert, L. E., Jr., and Channing, C. P. (1985) Follicular fluid modulation of functional LH receptor induction in pig granulosa cells, *J Reprod Fertil* 74, 407-418.
95. Reich, R., Miskin, R., and Tsafirri, A. (1985) Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation, *Endocrinology* 116, 516-521.
96. Hsueh, A. J., Dufau, M. L., and Catt, K. J. (1977) Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 592-595.
97. Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V., Barratt, C. L., and Publicover, S. J. (2006) Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores, *Hum Reprod Update* 12, 253-267.
98. Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, *EMBO J* 18, 1723-1729.
99. Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J. L., Acevedo, J. J., and Darszon, A. (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation, *Asian J Androl* 13, 395-405.
100. Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility, *Biol Reprod* 55, 684-692.
101. Breitbart, H., Rubinstein, S., and Etkovitz, N. (2006) Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C, *Mol Cell Endocrinol* 252, 247-249.

102. Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E., and Krapf, D. (2014) Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology, *Biochim Biophys Acta* 1842, 2610-2620.
103. Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Unates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Morales Garcia, A. A., and Giojalas, L. C. (2009) Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone, *PLoS One* 4, e8211.
104. Spehr, M., and Hatt, H. (2005) A potential role of odorant receptor agonists and antagonists in the treatment of infertility and contraception, *Curr Opin Investig Drugs* 6, 364-368.
105. Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J. A., Barbour, J., Zimmer, R. K., Neuhaus, E. M., and Hatt, H. (2004) Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis, *J Biol Chem* 279, 40194-40203.
106. Dey, S., Roy, D., Majumder, G. C., and Bhattacharyya, D. (2014) Extracellular regulation of sperm transmembrane adenylyl cyclase by a forward motility stimulating protein, *PLoS One* 9, e110669.

ANEXO 1.- ARTÍCULO DE REQUISITO



Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation



Aideé S. López-Torres ^{a, b}, María E. González-González ^a, Esperanza Mata-Martínez ^c, Fernando Larrea ^a, Claudia L. Treviño ^c, Mayel Chirinos ^{a, *}

^a Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Av. Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14080, Mexico City, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán, 04510, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2016

Accepted 3 January 2017

Available online 4 January 2017

Keywords:

Sperm function

Capacitation

Luteinizing hormone

Fertilization

ABSTRACT

In order to fertilize, spermatozoa must undergo physiological and biochemical changes during their transit along the female reproductive tract before reaching and fusing with the oocyte, process known as capacitation. Sperm modifications associated with capacitation are modulated by their interaction with molecules present in the female reproductive tract. During the woman fertile window, some reproductive hormones reach their maximum concentrations in serum, such as the luteinizing hormone (LH). Since spermatozoa preparing to fertilize may be exposed to LH, the purpose of this work was to study the effects of this hormone on intracellular Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_i$), protein tyrosine phosphorylation, sperm motility and acrosome reaction under capacitating conditions. The results showed that LH increases the duration and amplitude of Ca^{2+} oscillations. Furthermore, motility analysis indicated that LH decreases rapid progressive motility and that sperm hyperactivation as well as several kinetic parameters augment in the presence of 0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ of the hormone. In addition, these two hormone concentrations also consistently promoted protein tyrosine phosphorylation. However, no effects on acrosome reaction were observed. In conclusion, the evidence indicates that LH modulates several sperm function variables involved in capacitation, suggesting that may have an important and unexplored role during human fertilization.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Success of fertilization requires sperm ejaculated in the vagina being able to migrate from the seminal plasma into the cervical mucus and then all the way up through the uterus and oviduct to reach the ampulla and meet the ovulated oocyte. Freshly ejaculated spermatozoa are not capable of fertilizing, therefore during their transit along the female reproductive tract spermatozoa undergo a series of consecutive biochemical and molecular events that enable them to do so, process known as capacitation [1,2]. During this process, spermatozoa experiment a rise in intracellular concentrations of HCO_3^- and Ca^{2+} as well as a membrane hyperpolarization, events that trigger signal transduction cascades that promotes the appearance of a subpopulation of sperm with hyperactivated motility and the augmentation of protein tyrosine

phosphorylation (for review see Refs. [3–5]). Once in the vicinity of the oocyte, capacitated sperm must undergo the acrosome reaction, an exocytotic event that is required for oocyte outer vestments penetration and fusion with the female gamete [6].

Capacitation changes are modulated by molecules existing in the female reproductive tract. Previous evidences indicate that some proteins secreted by the uterus and the oviduct modify sperm ability to fertilize, such as glycodelin-A [7] and lactoferrin [8]. Among other components, female reproductive fluids contain a considerable amount of hormones and some of them reach their maximum concentrations in serum during the woman fertile window, such as the luteinizing hormone (LH) and estradiol. Additionally, progesterone (Pg) is secreted in micromolar concentrations by the cumulus-oocyte complex, hence these hormones are likely to modulate sperm fertilization capability (reviewed in Ref. [9]). Progesterone effects on sperm function have been exhaustively studied, being implicated in sperm capacitation and acrosome reaction [10,11], but estradiol and LH effects on sperm physiology have been poorly investigated.

* Corresponding author.

E-mail address: mayel.chirinos@incmnsz.mx (M. Chirinos).

The LH is a heterodimeric glycoprotein secreted by the pituitary and preovulatory LH surge induces ovulation. Therefore, it is reasonable to hypothesize that spermatozoa placed in the female reproductive tract during the fertile window may be exposed to this hormone. Indeed, it has been described the presence of LH in woman reproductive tract fluids such as cervical mucus [12] and follicular fluid [13,14]. Moreover, since the LH/hCG receptor exists in human fallopian tubes, its presence in the oviduct has been inferred [15]. On the other hand, investigations conducted earlier with human mature sperm indicated the presence of the LH/hCG receptor and that LH promote protein kinase A (PKA) activity in this cell [16]. Despite of this evidence, no further investigations about the potential effects of LH on human sperm have been carried out afterwards, so the aim of the present study was to investigate LH competence to modulate several sperm function variables under *in vitro* capacitating conditions.

2. Material and methods

2.1. Semen samples and sperm preparation

This study and the informed consent forms signed by the semen donors were approved by the Institutional Review Board of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Following 3–5 days of sexual abstinence, healthy normozoospermic donors provided fresh ejaculates by collection in sterile polyethylene cups. Semen samples were allowed to liquefy for at least 30 min and assessed according to procedures and reference values established by the W.H.O. [17]. To separate spermatozoa from seminal fluid, samples were centrifuged at $800\times g$ for 30 min through discontinuous density gradients (Isolate; Irvine Scientific, Irvine, CA). Afterwards, sperm pellets were washed with PBS and re-assessed for density and motility. For evaluations of intracellular calcium concentrations changes, motile sperm were obtained by the swim up technique in Human Tubal Fluid (HTF) medium [18], supplemented with 0.3% human serum albumin (Sigma) and 0.3 mM sodium pyruvate (Sigma). Only sperm samples with a total motility after processing above 80% were used for experiments.

2.2. Measurements of intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$ in single cell

Analysis of $[Ca^{2+}]_i$ changes in single cells were performed as described before [19]. Spermatozoa were loaded with 2 μM Fluo-3 AM (Invitrogen; Eugene, OR) in HTF medium devoid of human serum albumin and incubated for 30 min at 37 °C. After washing to remove unincorporated dye, cells were attached by the heads to 0.03% poly-L-lysine pre-treated coverslips. Subsequently, coverslips were mounted in a recording chamber (Harvard Apparatus; Holliston, MA) standing on the thermo regulated platform of an inverted fluorescence microscope (Olympus IX71; Olympus). Videos were acquired using the 60 \times microscope objective coupled to an iXon 888 camera with the IQ software (Andor Bioimaging; Wilmington, NC) and images were collected every 500 msec. Experimental design comprised microscope fields recording from 0 to 480 s, with addition of the stimuli (either HTF medium used as a control or LH) at second 60. Afterwards, 3 μM Pg was added at second 360 as a positive control, followed by addition of 5 mM $MnCl_2$ at second 450 to quench the fluorescence. Raw intensity values were analyzed with the Image J free software and fluorescence intensity (%) was calculated by normalizing fluorescence data (F) with respect to the maximum intensity obtained after Pg addition (considered as 100%) for each cell, after subtraction of the minimum intensity observed during the first minute (before addition of stimuli), using the equation: $(F_X - F_{Min}) \times 100 / (F_{Pg} - F_{Min})$.

The total recorded series were plotted against time. Only oscillations with amplitude above 10% were considered. Total cells analyzed were 51 for control and 58 for LH incubations, from 3 independent experiments.

2.3. Sperm incubations with LH

For sperm function studies, spermatozoa were incubated under capacitating conditions by resuspending at a density of $10 \times 10^6/ml$ in supplemented HTF medium, with and without different concentrations of LH from human pituitary (Sigma), and further incubated at 37 °C in 5% CO_2 and 95% humidity. As the physiological concentrations of LH in the female woman reproductive tract are unknown, serum values were used as reference, which ranges from a basal 0.1 $\mu g/ml$ to approximately 0.8 $\mu g/ml$ at the LH peak of the menstrual cycle for women age 18–30 [20]. At the end of incubations, sperm were further processed according to procedures described below to assess LH effects on protein tyrosine phosphorylation, motility and acrosome reaction (AR).

2.4. Tyrosine phosphorylation changes in sperm

Spermatozoa tyrosine phosphorylation studies were performed by Western blot. Sperm pellets equivalent to 0.75×10^6 cells obtained after incubations with and without LH were electrophoresed, electrotransferred onto nitrocellulose membranes and probed employing a monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 antibody (Millipore, Temelca, CA) diluted 1:5000 in TBS-Tween 20, followed by a secondary antibody g-anti-mIgG-HRP (Millipore) diluted 1:4000. For comparison purposes, homogeneous protein loading was corroborated by reprobing membranes with anti- β -tubulin (Sigma) diluted 1:50000. To evaluate changes in protein tyrosine phosphorylation, densitometric analysis using the Image Lab software (version 4; Bio-Rad) were performed, normalizing each phosphotyrosine intensity value by the corresponding β -tubulin intensity. Results were expressed as the relative density of phosphotyrosine/ β -tubulin (pY/tub). Values obtained at 4 h incubations in absence of LH were arbitrarily set as 1 to normalize the other intensity values.

2.5. Analysis of sperm motility

At the end of incubations, sperm aliquots of 10 μl were separated for observation under the microscope on 37 °C pre-heated slides. Spermatozoa motility were graded as: rapid progressive (A), slow progressive (B), non-progressive (C) or immotile (D), according to the W.H.O. criteria [17]. A minimum of 100 cells were evaluated for each experimental condition and the percentage of each type of motility was estimated. In a different set of experiments, samples were placed on cell count chambers (Leja Products BV, Netherlands) and evaluated by computer assisted sperm analysis (CASA) with a Sperm Class Analyzer[®] (SCA, MICROPTIC SL; Spain) that allowed the analysis of motility kinetic variables. For each experimental condition, 10 random fields were evaluated for a minimum total of 150 cells. To determine the percentage of hyperactivated cells in a sample, the cut-off values used were $VCL \geq 150$, $LIN \leq 50$ and $ALH \geq 3.5$, as provided by the equipment manufacturer. Control values obtained in absence of LH were arbitrarily set as 1 and experimental results were expressed as the fold change of treatments compared to the control.

2.6. Acrosome reaction evaluation

For analysis of effects on sperm AR, samples were fixed with 70% ethanol for evaluation as described previously [21]. Sperm aliquots were smeared on pre-treated slides and air-dried for staining with

20 $\mu\text{g/ml}$ of *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein (FITC-PSA; Sigma) at room temperature for 30 min. Slides were washed with PBS and evaluated under a fluorescence microscope. A minimum of 200 sperm were examined for each treatment and cells were classified into acrosome intact or reacted. Values were expressed as the percentage of acrosome reacted spermatozoa.

2.7. Statistical analysis

When appropriate, results were expressed as the mean \pm SEM of a minimum of three independent experiments. Data were analyzed

using one way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test. For intra assay analysis of LH effects on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and CASA motility, paired *t*-test was employed. Values were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Luteinizing hormone increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spermatozoa

The increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spermatozoa is one of the earliest capacitation associated event, so we decided to explore whether LH

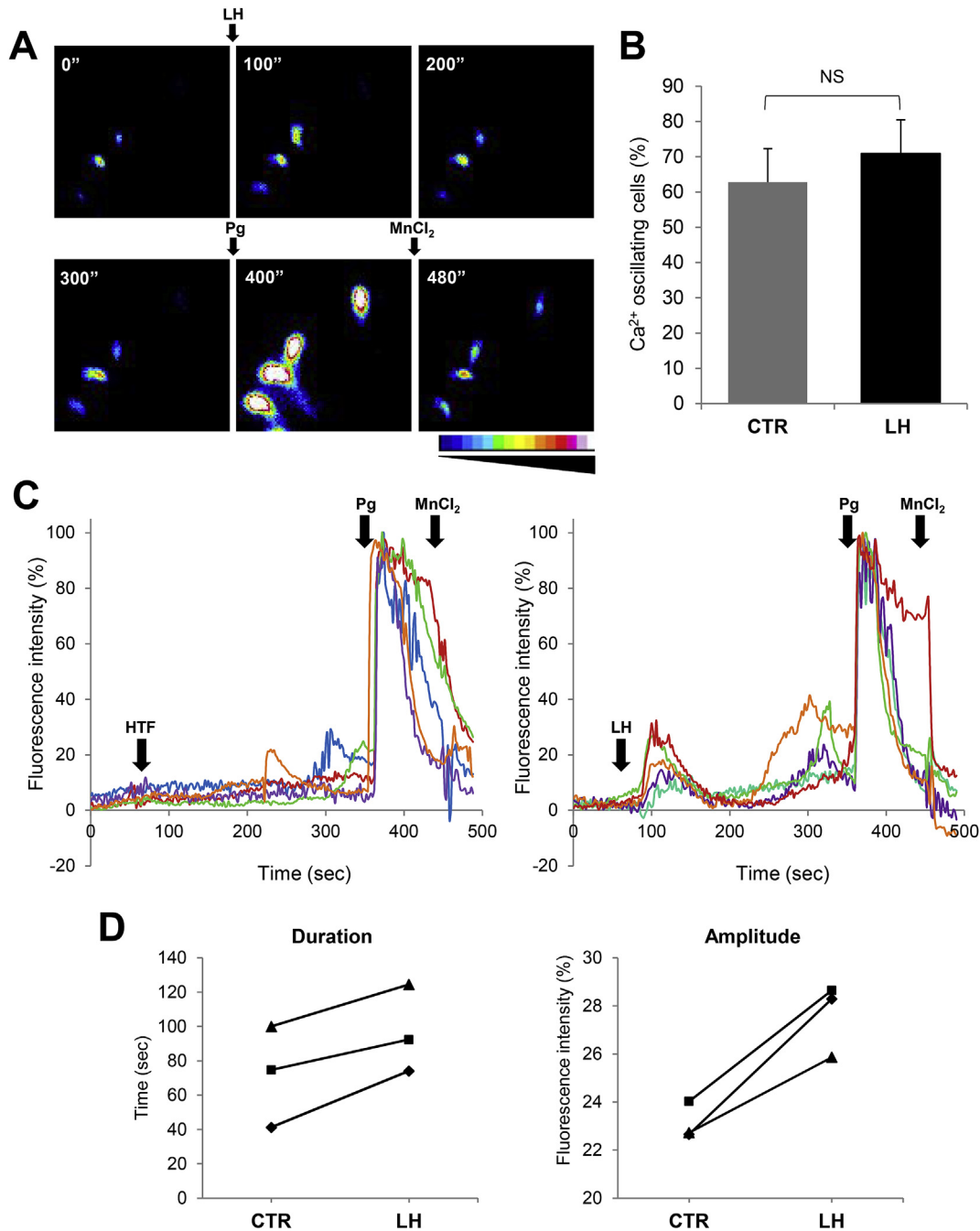


Fig. 1. LH increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Spermatozoa were challenged with either HTF medium (CTR) or LH (1 $\mu\text{g/ml}$) for recording of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes. (A) Image sequence of several spermatozoa exposed to LH, displaying $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes during the course of the experiment. Pg was added as positive control and was followed by MnCl_2 that quenched fluorescence. (B) Percentage of cells with Ca^{2+} oscillations after incubation with either HTF medium (CTR) or the hormone (LH). NS: non-significant. (C) Normalized fluorescence intensity traces of five individual cells after the addition of HTF/LH. Black arrows indicate the addition of HTF/LH, Pg and MnCl_2 . (D) Paired-aliquots from 3 different samples of CTR and LH incubations were analyzed for average duration and amplitude of Ca^{2+} oscillations. $p < 0.05$ CTR vs LH, for duration and amplitude.

had effects on this sperm function parameter by evaluating $[Ca^{2+}]_i$ changes in single cells. Sequential images of $[Ca^{2+}]_i$ changes of four representative spermatozoa challenged with LH are presented (Fig. 1A), showing Ca^{2+} fluctuations of lower intensity compared to that observed after the addition of Pg that was used as a control of cell responsiveness. Under this experimental design not all spermatozoa displayed $[Ca^{2+}]_i$ changes, and when comparing the percentage of cells showing Ca^{2+} oscillations under control (plus HTF medium) versus LH treatment, non-significant differences were observed (Fig. 1B). However, examination of individual traces of $[Ca^{2+}]_i$ changes revealed that responding cells challenged with HTF showed only one spontaneous delayed transient, whereas in the presence of LH displayed an immediate transient that in some cases was followed by a second one (Fig. 1C). Moreover, $[Ca^{2+}]_i$ transients seemed distinctly larger in the presence of the hormone, with fluorescence intensities of about 30–40%. Therefore, we investigated whether LH had effects on duration and amplitude of Ca^{2+} oscillations for paired aliquots from each sperm sample. Results, plotted as the average value obtained after addition of HTF and LH for each experiment, indicated that both variables consistently increased in the presence of the hormone (Fig. 1D).

3.2. Effects of LH on protein tyrosine phosphorylation and sperm motility

Since changes in motility patterns, including the appearance of a subpopulation of hyperactivated sperm, and increases in protein tyrosine phosphorylation are two of the best characterized features of sperm capacitation, we explored the effect of varying

concentrations of LH on these two variables. Spermatozoa incubated under capacitating conditions in the presence of LH were analyzed by Western blots in order to investigate changes in the abundance of tyrosine phosphorylation. In Fig. 2A, we show that two proteins of approximately 80 and 105 kDa showed basal phosphotyrosine reactivity at time 0 h. As expected under capacitating conditions, the intensity of these two protein bands increased after 4 h incubations [22,23], but in the presence of increasing concentrations of LH, a further augmentation on tyrosine phosphorylation was observed, that showed a peak at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and decreased at higher LH concentrations. When sperm were challenged with 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ of LH at different incubation times (Fig. 2B), we found that the phosphotyrosine increase in the presence of LH at 0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ was noticeable since the shortest incubation time evaluated (0.5 h) and was consistent until the longest incubation time (4 h). Similar results were observed when semen samples from different donors ($n = 9$) incubated with LH for 4 h were assessed, demonstrating that the observed phosphotyrosine augmentation was significantly higher at LH concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2C).

On the other hand, manual assessment of motility indicated that the percentage of cells with rapid progressive motility decreased from a 48% observed in the control incubation to 17, 5 and 22% when incubated with 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ of LH, respectively (Fig. 3A). Moreover, a higher incidence of slow progressive sperm was observed with LH at 1 $\mu\text{g/ml}$. In order to perform an objective evaluation of the motility changes, sperm incubated with LH were also evaluated using a CASA system that allowed determining the mean values of kinetic parameters (Table 1). Two hyperactivation

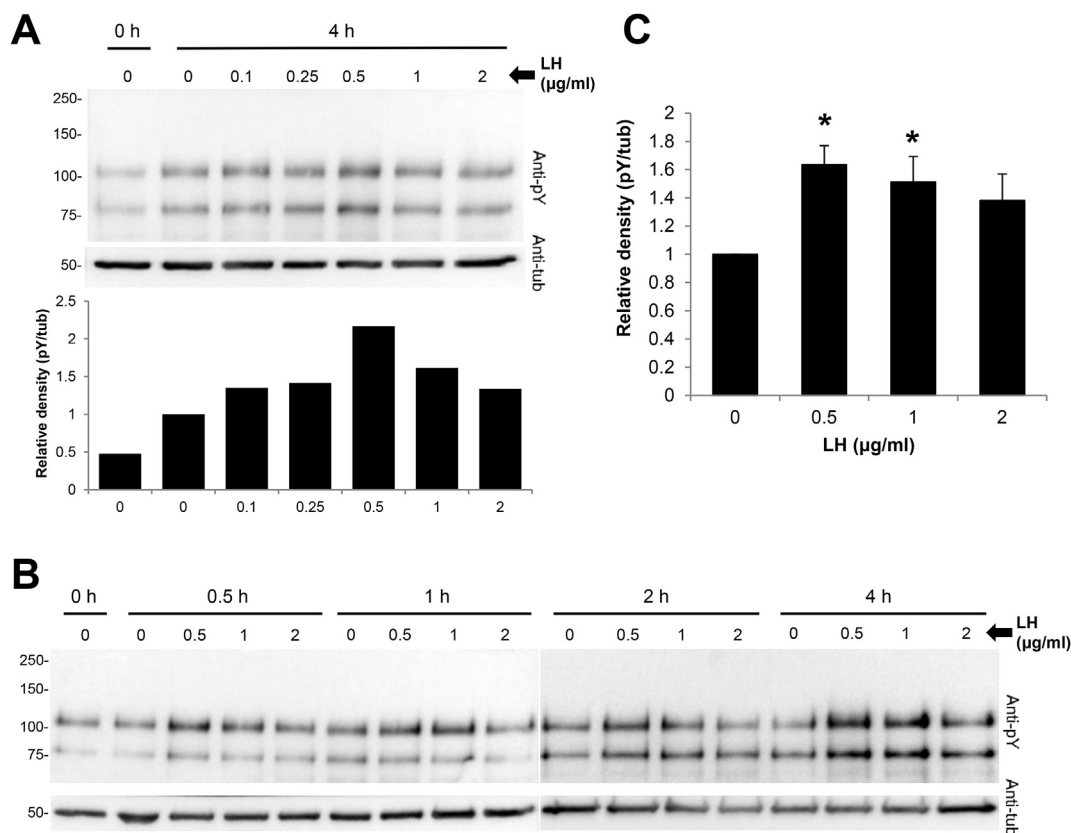


Fig. 2. Effect of LH on protein tyrosine phosphorylation. Sperm lysates were analyzed by Western blot for protein tyrosine phosphorylation and anti- β -tubulin that was used as loading control (representative Western blot are presented). (A) Concentration-response curve of LH at 4 h incubation, accompanied by densitometric analysis of the normalized intensities for pY/tub. (B) Time-course and concentration-response effect of LH on sperm proteins tyrosine phosphorylation. (C) Densitometric analysis of LH effect at 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ for 4 h on human sperm protein tyrosine phosphorylation ($n = 9$). (*) $p < 0.05$ vs LH (0 $\mu\text{g/ml}$).

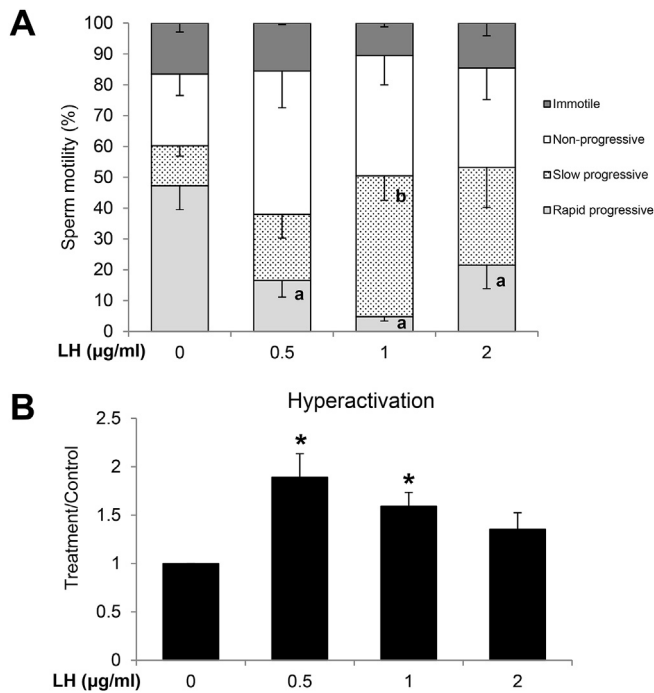


Fig. 3. Sperm motility after incubation with LH. (A) Manual motility analysis. Sperm were incubated in the absence and presence of different concentrations of LH for 4 h and motility types were scored according to W.H.O. criteria [17], $n = 4$. (a) $p < 0.05$ vs Rapid progressive from LH (0 µg/ml); (b) $p < 0.05$ vs Slow progressive from LH (0 µg/ml). (B) Effect of LH in the proportion of hyperactivated spermatozoa, analyzed by CASA. Values on Y axis (Treatment/Control) represents the fold change, considering the values in absence of hormone (LH, 0 µg/ml) as the control ($n = 7$). (*) $p < 0.05$ vs LH (0 µg/ml).

defining parameters, VCL and ALH, significantly increased in the presence of LH. In addition, VAP also significantly increased when sperm were incubated with 0.5 µg/ml of LH. Moreover, analysis of individual experiments showed that LH at 0.5 and 1 µg/ml increased the above mentioned kinetic variables in most of the experiments performed (see Supplemental Fig. 1). Consequently the percentages of hyperactivated cells were determined (Fig. 3B), revealing that incubations with LH at 0.5 and 1 µg/ml increased hyperactivation by 1.9 and 1.6 times, respectively.

3.3. Effect of LH on acrosome reaction

Given that sperm AR entails spermatozoa to be capacitated, we evaluated potential effects of LH on this sperm function variable. As expected, spontaneous AR increased as a result of the capacitation

process. However, 4 h incubations in the presence of different concentrations of LH showed no effect on AR (see Supplemental Fig. 2).

4. Discussion

The results presented in this work indicate LH ability to modulate sperm function variables related to capacitation. Intracellular Ca^{2+} concentration rise is a key second messenger of signal transduction pathways involved in major changes occurring during sperm capacitation such as motility and AR [24]. The fact that LH induced changes in some human sperm function variables opens the door to novel mechanisms of action to regulate capacitation. The mechanisms of action of LH in sperm cannot be ascertained from the results presented in this study. However, in somatic cells, LH/hCG receptor is coupled to G-proteins and gonadotropins binding to this receptor promote two signaling pathways: one that triggers stimulatory G-proteins (Gs), that in turn activates adenylylate cyclase, which increases intracellular cAMP and activates PKA (AC/cAMP/PKA); and the other where the hormones stimulate Gq proteins that initiate the phospholipase C/inositol phosphate/phosphokinase C (PLC/IP/PKC) signaling pathway [25]. Both signaling cascades have been involved in sperm capacitation [5,26,27]. Accordingly, it is possible that LH binding to LH/hCG receptors located in sperm stimulates either of these pathways to trigger some of the effects here described. However, determination of LH mechanisms of action on sperm shall be subject of further investigations.

Previous investigations indicate that LH is a constituent of several human female reproductive tract secretions [12–14]. The pituitary gland is the major source of LH, but it might also be locally produced by female reproductive tract tissues. Indeed, evidences of extrapituitary production of LH in different models have been collected [28] and hCG production has been demonstrated in fallopian tubes [15] and endometrium [29]. Therefore, a spatio-temporal coincidence of human sperm with LH is plausible during their transit along the female reproductive tract in the course of the fertile window. Results presented here indicate that LH effects on sperm function are mostly seen at concentrations of 0.5–1 µg/ml, resembling the highest serum concentrations described for women during the LH surge [20], and therefore suggesting that it may modulate sperm function only during the LH raise that precedes ovulation. Actually, in granulosa cells, *in vitro* experiments have shown that 1 µg/ml of LH increases the amount of cyclic AMP and the secretion of progesterone [30]. Nevertheless, it is possible that lower concentrations of the hormone are required *in vivo*, where other molecules coexisting in the female reproductive tract may potentiate LH effects, such as estradiol [31].

As far as we know, this is the first study to address a direct effect

Table 1
Sperm motility kinetic parameters evaluated by CASA after 4 h incubation with LH.

	LH (µg/ml)			
	0	0.5	1	2
VCL (µm/s)	100.97 ± 3.61	108.8 ± 4.77 (*)	109.85 ± 5.33 (*)	106.61 ± 5.60
VSL (µm/s)	42.85 ± 2.39	44.11 ± 2.53	45.25 ± 3.72	44.2 ± 3.36
VAP (µm/s)	59.57 ± 1.83	61.8 ± 2.10 (*)	63.82 ± 3.40	62.2 ± 3.07
LIN (%)	44.11 ± 2.17	42.11 ± 2.44	42.78 ± 2.91	42.55 ± 2.73
STR (%)	70.89 ± 2.43	69.9 ± 2.46	69.55 ± 3.19	69.13 ± 3.19
WOB (%)	60.91 ± 1.30	59.03 ± 1.47	60.33 ± 1.34	60.35 ± 1.22
ALH (µm)	2.53 ± 0.08	2.71 ± 0.13	2.67 ± 0.08 (*)	2.59 ± 0.09
BCF (Hz)	13.63 ± 0.41	13.67 ± 0.51	14.13 ± 0.60	14.06 ± 0.64

VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity (LIN = VSL/VCL); STR: straightness (STR=VSL/VAP); WOB: wobble (WOB=VAP/VCL); ALH: amplitude of lateral head; BCF: beat cross frequency. Values are presented as mean ± SEM, $n = 7$. Data was analyzed by paired *t*-test. (*) $p < 0.05$ vs control (LH, 0 µg/ml).

of LH on human sperm function. Interestingly, LH showed the ability to stimulate calcium influx, protein tyrosine phosphorylation and changes in motility but had no effect on sperm AR, indicating that activates specific pathways in this cells. In summary, LH may play a role in sperm capacitation during the fertile window being likely to assist during the synchronization of events that culminate with sperm fertilization of the oocyte. Moreover, these results could be relevant for the management of natural as well as assisted reproduction.

Acknowledgments

ASLT is PhD student at the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and recipient of a fellowship from CONACyT (508620). This study was conducted as part of her doctoral thesis. We would like to thank Paulina Torres Rodríguez and Fabio Herrera Rodríguez for their support with semen samples processing and technical assistance. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, Mexico (grant CB-154923 to MC), Dirección General de Asuntos de Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/UNAM) (grant IN203116 to CT) and The Alexander von Humboldt Foundation (grant w/o number to CT).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.010>.

Transparency document


Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.010>.

References

- [1] C.R. Austin, The capacitation of the mammalian sperm, *Nature* 170 (1952) 326.
- [2] M.C. Chang, Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, *Nature* 168 (1951) 697–698.
- [3] R.K. Naz, P.B. Rajesh, Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 (2004) 75.
- [4] R.J. Aitken, B. Nixon, Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored, *Mol. Hum. Reprod.* 19 (2013) 785–793.
- [5] P.E. Visconti, D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltran, J.J. Acevedo, A. Darszon, Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation, *Asian J. Androl.* 13 (2011) 395–405.
- [6] M.G. Buffone, N. Hirohashi, G.L. Gerton, Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis, *Biol. Reprod.* 90 (2014) 112.
- [7] S. Oehninger, C.C. Coddington, G.D. Hodgen, M. Seppala, Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida, *Fertil. Steril.* 63 (1995) 377–383.
- [8] C.M. Zumoffen, E. Massa, A.M. Caille, M.J. Muncie, S.A. Ghersevich, Effects of lactoferrin, a protein present in the female reproductive tract, on parameters of human sperm capacitation and gamete interaction, *Andrology* 3 (2015) 1068–1075.
- [9] A.S. Lopez-Torres, M. Chirinos, Modulation of human sperm capacitation by progesterone, estradiol, and luteinizing hormone, *Reprod. Sci.* 24 (2) (2017), <http://dx.doi.org/10.1177/1933719116641766> ([Epub ahead of print, 2016 Apr 12]), (in press).
- [10] A.E. Calogero, N. Burrello, N. Barone, I. Palermo, U. Grasso, R. D'Agata, Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action, *Hum. Reprod.* 15 (Suppl 1) (2000) 28–45.
- [11] J.C. Kirkman-Brown, E.L. Punt, C.L. Barratt, S.J. Publicover, Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa, *J. Androl.* 23 (2002) 306–315.
- [12] B. Moreno-Escallon, S. Chappel, L. Blasco, Luteinizing hormone in cervical mucus, *Fertil. Steril.* 37 (1982) 536–541.
- [13] M.J. de los Santos, V. Garcia-Laez, D. Beltran, E. Labarta, J.L. Zuzuarregui, P. Alama, P. Gamiz, J. Crespo, E. Bosch, A. Pellicer, The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: is it hypoandrogenic? *Hum. Reprod.* 28 (2013) 224–229.
- [14] L. Pacella, D.L. Zander-Fox, D.T. Armstrong, M. Lane, Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment, *Fertil. Steril.* 98 (986–994) (2012) e981–982.
- [15] Z.M. Lei, P. Toth, C.V. Rao, D. Pridham, Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (1993) 863–872.
- [16] A. Eblen, S. Bao, Z.M. Lei, S.T. Nakajima, C.V. Rao, The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2643–2648.
- [17] World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, fourth ed., Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, U.K. ; New York, NY, 1999.
- [18] P. Quinn, J.F. Kerin, G.M. Warnes, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, *Fertil. Steril.* 44 (1985) 493–498.
- [19] E. Mata-Martinez, O. Jose, P. Torres-Rodriguez, A. Solis-Lopez, A.A. Sanchez-Tusie, Y. Sanchez-Guevara, M.B. Trevino, C.L. Trevino, Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging, *J. Vis. Exp.* (2013) e50344.
- [20] B.M. Sherman, S.G. Korenman, Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life, *J. Clin. Invest* 55 (1975) 699–706.
- [21] P. Caballero-Campo, M. Chirinos, X.J. Fan, M.E. Gonzalez-Gonzalez, M. Galicia-Chavarria, F. Larrea, G.L. Gerton, Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function, *Biol. Reprod.* 74 (2006) 760–768.
- [22] A. Carrera, J. Moos, X.P. Ning, G.L. Gerton, J. Tesarik, G.S. Kopf, S.B. Moss, Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation, *Dev. Biol.* 180 (1996) 284–296.
- [23] C. Lachance, S. Goupil, R.R. Tremblay, P. Leclerc, The immobilization of human spermatozoa by STAT3 inhibitory compound V results from an excessive intracellular amount of reactive oxygen species, *Andrology* 4 (2016) 133–142.
- [24] C. Jimenez-Gonzalez, F. Michelangeli, C.V. Harper, C.L. Barratt, S.J. Publicover, Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores, *Hum. Reprod. Update* 12 (2006) 253–267.
- [25] J. Choi, J. Smitz, Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference, *Mol. Cell Endocrinol.* 383 (2014) 203–213.
- [26] H. Breitbart, S. Rubinstein, N. Etkovitz, Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C, *Mol. Cell Endocrinol.* 252 (2006) 247–249.
- [27] P. Leclerc, E. de Lamirande, C. Gagnon, Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility, *Biol. Reprod.* 55 (1996) 684–692.
- [28] S. Harvey, C. Aramburo, E.J. Sanders, Extrahypothalamic production of anterior pituitary hormones: an overview, *Endocrine* 41 (2012) 19–30.
- [29] G. Zimmermann, W. Ackermann, H. Alexander, Epithelial human chorionic gonadotropin is expressed and produced in human secretory endometrium during the normal menstrual cycle, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 1053–1065.
- [30] K.G. Osteen, L.D. Anderson, L.E. Reichert Jr., C.P. Channing, Follicular fluid modulation of functional LH receptor induction in pig granulosa cells, *J. Reprod. Fertil.* 74 (1985) 407–418.
- [31] R. Reich, R. Miskin, A. Tsafirri, Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation, *Endocrinology* 116 (1985) 516–521.

ANEXO 2.- ARTÍCULO DE REVISIÓN

Modulation of Human Sperm Capacitation by Progesterone, Estradiol, and Luteinizing Hormone

Reproductive Sciences
2017, Vol. 24(2) 193-201
© The Author(s) 2016
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1933719116641766
journals.sagepub.com/home/rsx


Aideé Saray López-Torres, PhD^{1,2}, and Mayel Chirinos, PhD¹

Abstract

Sperm residency in female reproductive tract is essential to undergo functional changes that allow the cell to encounter the oocyte and fertilize it. Those changes, known as capacitation, are modulated by molecules located in the uterotubal surface and fluids. During the fertile window, there is a notable increase in some reproductive hormones such as progesterone, estradiol, and luteinizing hormone in the female reproductive tract, so spermatozoa are exposed to these hormones in an environment that must favor gamete encountering and fusion. This spatiotemporal coincidence suggests that they are suitable candidates to modulate sperm function in order to synchronize the events that ultimately allow the success of fertilization. The presence of receptors for these hormones in the human sperm has been described, but their physiological relevance and mechanisms of action have been either subject of controversy or not properly investigated. This review intends to summarize the evidence that support the participation of these hormones in the regulation of sperm capacitation.

Keywords

sperm capacitation, fertilization, progesterone, estradiol, luteinizing hormone

Introduction

Although ejaculated spermatozoa are fully differentiated cells, they are not capable of fertilizing an oocyte. In order to surpass this condition, during the transit along the female reproductive tract, they experiment a series of consecutive biochemical and molecular events known as capacitation that enable the sperm to reach the cumulus–oocyte complex, penetrate the outer vestments of the egg, and fuse with the female gamete.^{1,2} After semen deposition in the vagina, spermatozoa migrate from the membrane-stabilizing seminal plasma into the acidic vaginal environment and then into the cervical mucus, where sperm plasma membranes are scrubbed to facilitate the removal of surface molecules such as cholesterol.³ This process is assisted by cholesterol acceptors such as albumin,⁴ inducing an increased fluidity of the plasma membrane⁵ that is accompanied by a rise in $[Ca^{2+}]_i$ ⁶ and $[HCO_3^-]_i$ ⁷ as well as a membrane hyperpolarization.⁸ These events initiate a signal transduction cascade that ultimately promotes sperm protein tyrosine phosphorylation and motility changes that includes the appearance of the hyperactivated motility.⁹ Capacitation changes prepare cells to undergo the acrosome reaction (AR), an exocytotic event that allow the release of proteases located in the head of spermatozoa that contribute to the penetration of the outer vestments of the oocyte,¹⁰ a process that may be stimulated by progesterone (P4) and/or zona pellucida (ZP) proteins.¹¹⁻¹⁴

The complex changes occurring during sperm capacitation are modulated by its interaction with molecules present in the female reproductive tract. In fact, *in vitro* capacitation can be achieved by incubation of sperm in media that imitates the fluids of the female reproductive tract that regularly contain serum albumin, Ca^{2+} , and HCO_3^- ¹⁵ plus other variable components meant to bring energy to the cells and a proper osmotic pressure. However, female reproductive fluids also contain a considerable amount of molecules not commonly included in capacitation media that may also be relevant for this process. During the fertile window in women, corresponding to the periovulatory phase of the menstrual cycle, some reproductive hormones reach their maximum concentrations in serum, such as the luteinizing hormone (LH) and the follicle stimulating hormone (FSH) involved in ovulation.¹⁶ Besides, there is a marked raise of the estradiol (E2) concentration in the female

¹ Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, DF, Mexico

Corresponding Author:

Mayel Chirinos, Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan 14080, México D.F., Mexico.
Email: mayel.chirinos@incmnsz.mx

reproductive tract¹⁶ while P4 is secreted in micromolar concentrations by the cumulus–oocyte complex into the vicinity of the gamete encountering place.¹⁷ Consequently, hormonal participation in sperm function modulation has been largely hypothesized and further supported by evidences of the presence of LH/ human chorionic gonadotropin (hCG),¹⁸ P4,¹⁹ and E2²⁰ receptors in human mature sperm. The first proof of hormonal effects on sperm was presented in 1988,²¹ showing an increase in human sperm membrane potential when incubated in the presence of testosterone, P4, and E2. After that research, the role of P4 as a sperm function modulator has been broadly investigated but E2 and LH have been rarely subject of study. Therefore, specific actions and mechanisms by which hormones of the female reproductive cycle could modulate sperm physiology are still unclear. In this review, we summarize the evidences of the participation of the ovarian steroid hormones P4 and E2 as well as the pituitary glycoprotein hormone LH, in human sperm capacitation and, when possible, the signaling pathways likely to be involved. Besides, other capacitation-related events such as chemotaxis, sperm metabolism during its residence in the female tract, and survival are also revised.

Ovarian Steroid Hormones

In addition to contain and support the maturation of the female gametes, the ovary is also an endocrine gland that secretes steroid hormones such as P4 and estrogens that are crucial to normal reproductive development and fertility. Progesterone is mostly secreted by cumulus and granulosa cells during ovulation and by corpus luteum cells in the ovary during the post-ovulatory phase of the menstrual cycle. This hormone is essential for reproductive events associated with pregnancy such as ovulation, uterine and mammary gland development, and onset of labor.²² On the other hand, estrogens are a group of 3 major hormones known as E2, estrone, and estriol, which work together to promote the development of female sex features during puberty as well as to assure the adequate function of the female reproductive organs to ensure fertility. Estradiol is the most potent and prevalent estrogen produced in nonpregnant reproductive age women. It is mainly secreted by the granulosa cells in the ovary, mostly by those supporting the maturation of the leader follicle in order to promote the development of the uterine lining for implantation of the egg and the release of LH from the anterior pituitary to trigger ovulation.²³

Mechanism of Action of Steroid Hormones

Being steroid hormones implies that E2 and P4 have some general characteristics that are intrinsically associated to their function. As a consequence of their low molecular weight and lipophilic nature, cell membranes are permeable to these hormones so they do not need surface receptors to mediate their effects on cell functions. Several steroid hormone mechanisms of action have been described. In the classical mechanism of action, the hormones bind to receptors located in the cell cytoplasm and translocate to the nucleus in order to bind to specific

DNA sequences in the chromatin and exert genomic actions by modulating transcriptional activity (reviewed in²⁴). However, the mature sperm is a terminally differentiated cell that has a tightly condensed chromatin and thus any major transcriptional activity should be absent, so steroid hormone effects on spermatozoa are likely to be mediated by a different mechanism. In contrast to the relatively well characterized genomic model of steroid action, the nongenomic model propose that steroid hormones can also initiate signaling from the exterior through membrane receptors that transduce signals to the cell. Nongenomic steroidogenic signaling is usually characterized by responses observed within short periods of time (seconds to minutes) that are generally considered too rapid to involve transcriptional and translational events.²⁵ In capacitating human sperm, P4 induced relevant changes such as Ca²⁺ influx occurs within seconds while AR is observed after few minutes,^{26–28} suggesting that at least this hormone uses nongenomic mechanisms of action on sperm.

Effects of P4 on Sperm

As mentioned before, P4 is the most exhaustively studied molecule regarding its participation on sperm function modulation. There is plenty evidence of its participation in all capacitation events assessed so far but the precise mechanisms employed to induce its effects are still not fully understood. Progesterone has not only been implicated in the stimulation of capacitation,²⁹ including hyperactivated motility³⁰ and flagellar bending^{31,32}, but also in chemotaxis,³³ AR,³⁴ as well as sperm-ZP binding and sperm-oocyte fusion.³⁵ Moreover, its effect on sperm function has been well established not only in human²⁹ but in all mammalian models investigated so far such as boar³⁶ and mouse.¹⁴

The presence of a P4 receptor (PR) in human sperm has been studied by many groups by different technical approaches (for review see³⁷). The classical PR isoforms PRA (94 KDa) and PRB (116 KDa) were identified on the plasmatic membrane as well as in the nucleus, the mitochondria, and the flagellum.³⁸ Besides it has also been described the presence of nonclassical receptors of 54 and 57 kDa located in the plasmatic membrane³⁹ plus a truncated PR of 38 kDa that has been located in the mitochondrial membrane.⁴⁰ Moreover, recent investigations have demonstrated that a sperm-specific Ca²⁺ channel named CatSper responds to the stimulation of P4.^{41,42} Nevertheless, despite the membrane as well as inside detection of the PR, P4 effects on sperm capacitation seems to be primarily mediated by the activation of plasma membrane receptors.^{43,44}

Since P4 production is constrained to the cumulus–oocyte complex during ovulation, its concentration along the female reproductive tract relies on its diffusion, resulting in a P4 gradient. Such hormone gradient may have an important physiological role during fertilization since increasing concentrations of P4 allowed the selection of a population of better quality spermatozoa from subfertile samples and stimulated the completion of capacitation in some spermatozoa that could not do it by themselves.⁴⁵ In vitro tests performed by several research

Table 1. Dose-Dependent Effects of Progesterone on Different Sperm Function Variables.^a

Effects of P4 on sperm function	pmol/L	nmol/L	μmol/L
Chemotaxis	46	31	31
Cholesterol efflux			38
Ca ²⁺ influx		47,48	48,49
Protein tyrosine phosphorylation		47	47
Sperm motility		47	47
Hyperactivation		30	30,47
Acrosome reaction			12,38
Acrosin activity induction			38
Sperm-ZP binding and oocyte penetration			35

Abbreviations: P4, progesterone; ZP, zona pellucida.

^aSuperscript numbers correspond to references as indicated in the references section.

groups have demonstrated that P4 effects on sperm are concentration dependent (see Table 1). For instance, at nanomolar concentrations P4 induces Ca²⁺ influx that stimulates sperm motility and increases activity of tyrosine kinases, while at micromolar concentrations promotes total sperm motility, progressive motility, and hyperactivation as well as tyrosine phosphorylation of different kinases and AR.⁴⁷ Similar concentration dependent effects of P4 on capacitation-associated changes have been described in studies with rhesus macaque's spermatozoa.⁵⁰ Altogether, the evidences suggest that human sperm have several PR that may initiate the signaling pathways involved in the regulation of different sperm functions in a concentration-dependent way.

Progesterone and capacitation. Many investigations support that P4 stimulates some of the major changes associated with sperm capacitation such as Ca²⁺ influx,⁴⁸ protein tyrosine phosphorylation,⁴³ and hyperactivation.³⁰ Progesterone has a biphasic effect on the influx of Ca²⁺: a first peak of Ca²⁺ entry is observed during the first minute of incubation and is caused mainly by Ca²⁺ influx from extracellular environment, while the second raise of this ion occurs after 5 minutes of incubation, is sustained for 15 to 20 minutes, and is likely due to Ca²⁺ release from Ca²⁺ stores localized in the flagellum.^{31,49} Simultaneously, P4 also stimulates [Na⁺]_i⁵¹ and Cl⁻ efflux.⁵² These ionic changes promote a raise in pHi that activates soluble adenylyl cyclase (AC)⁵³ and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production⁵⁴ that derives in stimulation of protein tyrosine phosphorylation⁴³ and hyperactivation.³⁰ Moreover, P4 increases protein kinase B (known as AKT) phosphorylation in the flagellum of sperm, specifically on Thr 308 and Ser 473.⁴⁷ Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway in response to P4 is dependent on Ca²⁺, and the CatSper channel seems to be involved in this signaling pathway since the inhibitor mibefradil significantly reduced P4 mediated AKT phosphorylation required for motility and hyperactivation.⁵⁵ These results are further supported by the observation that mice sperm from null mutants for CATSPER genes cannot hyperactivate.⁵⁶ Interestingly, P4 also induces the Janus kinase 1/2⁵⁷ and the Src kinase⁵⁸ pathways activated upon

capacitation, all of what suggest that P4 may modulate capacitation changes by different phosphorylation pathways.

Progesterone and chemotaxis. Sperm chemotaxis is the mechanism that allows sperm guidance toward eggs. It has been fully demonstrated in species where external fertilization demands a mechanism to support gamete encountering such as in the marine invertebrates.⁵⁹ However, mammals are internal fertilizers where sperm migrates toward the egg in the physically constrained environment of the female reproductive tract. A chemoattractant effect has been attributed to P4 in gradients from picomolar ranges up to micromolar levels in several mammalian sperm (reviewed in⁶⁰). Progesterone is the major component of the follicular fluid, creating a P4 gradient from the cumulus mass toward the oviduct. It has been shown that P4 secreted by cumulus cells induces chemotaxis in sperm of human^{33,61} and rabbit.⁶² The human sperm seems to be highly sensitive to P4 since at picomolar concentrations alter their orientation in a field by the initial activation of the transmembrane AC-cAMP-protein kinase A (PKA) pathway, followed by protein tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization (through the inositol trisphosphate receptor and store-operated channels), and the final activation of the soluble guanylyl cyclase - cyclic guanosine monophosphate - phospho kinase G cascade.⁴⁶ However, a chemotactic response of mouse sperm to P4 has not been determined,⁶³ creating a controversy concerning the ability of this hormone to act as a general chemoattractant.

Progesterone and sperm metabolism. An adequate energetic metabolism is required by sperm to survive during its pass through the female reproductive tract. The main sources of energy used by sperm during female tract residency are glucose and sodium pyruvate, both of which are known to promote capacitation.^{64,65} Interestingly, in human sperm has been described that P4 induces the enzymatic activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, the key rate-limiting enzyme in the pentose phosphate pathway that is the main responsible for the glucose metabolism. Moreover, P4 may also have a lipolytic effect in sperm since it promotes a decrease in the intracellular content of triglycerides, phenomenon that is accompanied by an increase in lipase activity,³⁸ indicating that P4 stimulates glucose as well as lipid metabolism in sperm to produce the energy required to fertilize.

Progesterone and AR. The stimulatory effect of P4 on sperm AR has been widely studied in many species, such as stallion,⁶⁶ bovine,⁶⁷ mouse,⁶⁸ and pig.⁶⁹ In 1989, it was demonstrated that P4 present in follicular fluid mediates a rapid induction of AR on human capacitated sperm.¹² Moreover, it has been demonstrated that when mouse and human spermatozoa are exposed to P4 before addition of ZP, there is an enhanced stimulation of AR that is higher than that observed with the agonists alone, combined or presented in the inverse order, suggesting that the hormone exerts a priming effect on ZP-induced exocytosis.^{14,70} It has been shown that the PKA/A-kinase anchoring proteins⁷¹ and protein kinase C (PKC)^{72,73} pathways are involved in P4

induced AR. Src kinase may also participate in this process since blocking its activity inhibits P4-induced AR.⁵⁸ Furthermore, diacylglycerol is produced during human sperm AR in response to P4, which may be involved in membranes fusion during the exocytosis process.⁷⁴

Effects of E2 on Sperm

As early as in 1958, it was described that sperm capacitation in the rabbit uterus occurs more rapidly when estrogen is the predominant gonadal hormone,⁷⁵ but it was not until 1999 that it was shown the presence of a functional estrogen receptor (ER) on human sperm surface with apparent molecular mass of 29 kDa.⁷⁶ There are 2 classic isoforms of ER, α and β , and both are expressed in human sperm.⁷⁷ ER α has been detected as a 67 kDa molecular mass protein,⁷⁸⁻⁸⁰ similar to that described in other cell types, but a 45 kDa variant has also been observed.⁷⁹ On the other hand, a 55 kDa ER β has been described in sperm^{78,80} as well as a 64 kDa isoform.⁷⁹ Regarding their localization, there has been some controversy probably due to the existence of several variants for each receptor and/or the use of antibodies with different specificities. Some evidence points out that ER α is located in the midpiece and the proximal region of the tail while ER β is placed in the flagellum,⁷⁸ but other investigators found that ER α was located in the equatorial or upper postacrosomal region of the sperm head whereas ER β seems to be located in the midpiece.⁷⁹ Recent immunolocalization studies by electron microscopy suggest that ER α is situated solely in the midpiece, while ER β is in the midpiece and the principal piece of the flagellum, possibly in the mitochondria.⁸⁰ It is worth to mention that all evidences collected up to date support ER β presence in the flagellum.

Commonly, ER α and ER β located at plasma membrane lead to cAMP and Ca²⁺ generation that ultimately activate proximal kinases (Src, PI3K) and distal kinases (extracellular signal-regulated kinase (ERK), AKT),⁸¹ pathways that have already been described to participate during sperm capacitation and AR. However, recent investigations suggest that E2 effects are mediated by a G protein-coupled estrogen receptor, specifically by GPR30, which is believed to be a membrane form of the ER that mediates nonclassical estrogen signaling.⁸² GPR30 activates the PI3 kinase and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) through epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation, cAMP production, and Ca²⁺ mobilization.⁸³ Its presence in human spermatozoa has not been investigated, but it has been described in rat Sertoli cells,⁸⁴ spermatids,⁸⁵ and epididymis,⁸⁶ as well as in the neck of equine spermatozoa,⁸⁷ prompting investigations about the presence and possible role of GPR30 in human sperm physiology.

Estradiol and capacitation. Concerning a possible role of E2 during capacitation, it has been described that this hormone has a dose-dependent stimulating effect in sperm cholesterol efflux, promotes a rapid influx of Ca²⁺ from the extracellular medium, and promotes an increase in the protein tyrosine phosphorylation.^{76,80} Moreover, early investigations suggested that E2

increases velocity and sustains sperm motility,⁸⁸ which is consistent with the ER localization in the flagellum. Indeed, a man with homozygous inactivating mutation in the ER α gene, consequently lacking a functional ER α , proved to have normal genitalia and sperm density, but sperm motility was severely decreased.⁸⁹ Recently, it has been shown that E2 at 1 and 10 nmol/L induces sperm motility, but this effect significantly decreased at 1 mmol/L, suggesting a biphasic effect on this sperm function variable.⁸⁰ However, the effect of E2 on human sperm hyperactivation has not been subject of investigation. In hamster sperm, E2 did not affect sperm hyperactivation but when sperm were exposed to E2 at the same time or before exposure to P4, E2 suppressed P4-enhanced hyperactivation.⁹⁰ Nevertheless, E2 addition either before or after capacitation had no effect on human sperm ability to fuse with oocytes when it was evaluated by the hamster egg penetration test.⁹¹ The evidences herein presented suggest a subtle modulation by this hormone under in vitro capacitation conditions, but its participation on sperm function regulation when interacting with other molecules in vivo seems to be significant for fertilization achievement.

Estradiol and sperm metabolism. As expected, sperm capacitation demands metabolic modifications to adapt to the changing female reproductive tract environment. Under capacitating conditions, E2 enhances oxidative metabolism and intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentrations in human sperm.⁸⁸ Besides, E2 decreases sperm triglycerides content, induces lipase activity, and promotes β -oxidation of the fatty acids.⁸⁰ Interestingly, it has been described that human sperm expresses and secretes insulin,⁹² which is dose-dependently stimulated by E2,⁸⁰ providing a potential autocrine regulation of glucose metabolism based on the cell energetic needs.

Estradiol and AR. Several investigations indicate that E2 has no direct effect on AR.^{91,93} However, it negatively regulates the Ca²⁺ influx and the AR induced by P4.^{20,76,93} Besides, extracellular ATP induces a rapid plasma membrane depolarization followed by AR in capacitated sperm, but sperm preincubation with 1 μ mol/L E2 inhibited the extracellular ATP stimulation of AR.⁹⁴

Estradiol and sperm survival. In various cell types, it has been described that E2 stimulates the activation of the PI3K/AKT pathway and ERK1/2 pathway to inhibit apoptosis,⁹⁵ so it has been proposed a role for E2 in human sperm survival. Upon E2 exposure, it has been observed an enhanced phosphorylation of the proteins involved in the PI3K/AKT pathway like pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1, AKT, glycogen synthase kinase 3, B-cell lymphoma 2, and ERK1/2, all of which have been involved in cell survival. Its actions seem to be mediated by the specific interaction of ER α with the regulatory subunit of PI3K and ER β association with AKT.⁷⁸ However, a direct effect of E2 on sperm survival has not been investigated.

Pituitary Glycoprotein Hormones

The gonadotropins are glycoprotein polypeptide hormones that regulate sexual development and reproductive function, acting on the gonads to control gamete and sex hormones production. Due to its proteic nature, gonadotropins require cell plasma membrane receptors to mediate their effects. The human gonadotropins are FSH and LH, both of pituitary origin, and the hCG that is produced by the placenta. The release of LH and FSH is mediated by the gonadotropin-releasing hormone, which is a decapeptide of hypothalamic origin that binds to a receptor located on pituitary gonadotrophs. Luteinizing hormone promotes ovulation and during the luteal phase of the menstrual cycle stimulates the secretion of E2 and P4 by the corpus luteum.⁹⁶ Luteinizing hormone and hCG are heterodimeric glycoproteins constituted by the α and β subunits and are members of a hormone family that also includes thyroid-stimulating hormone and FSH.⁹⁷ The α subunit of LH comprises 92 amino acids and is almost identical to that of hCG, while β subunits are unique for each hormone and regulate their physiological functions and half-life.⁹⁸ Luteinizing hormone and hCG bind to the same receptor, although they have divergent temporal patterns of expression, and recent evidences suggest that they trigger different cascades of events following receptor binding.⁹⁹ The LH/hCG receptor is a glycoprotein with 7 transmembrane domains belonging to the G protein-coupled receptor family and consists of 2 major domains of similar size, an extracellular exodomain responsible for high affinity hormone binding and a membrane-associated endodomain where receptor activation occurs.¹⁰⁰ Several variants of the LH/hCG receptor have been described in rat, pig, and human ovary, with a diversity of molecular masses of 92, 80, 68, 59, 52, and 48 kDa.¹⁰¹ However, it seems that human sperm only have the LH/hCG receptor variant with a molecular mass of 80 kDa, localized in head, midpiece, and flagellum.¹⁸

The immediate response of target cells to the binding of LH is an increase in AC activity mediated by intracellular, membrane-associated G-proteins. The resulting increase in cAMP ultimately leads to a rise in steroid hormones synthesis and secretion.¹⁰² In the ovary, LH/hCG receptor stimulation by LH activates 2 intracellular signaling pathways. One is the above-mentioned AC/cAMP/PKA pathway,¹⁰³ and the other involves phospholipase C stimulation, formation of inositol phosphate, and rising of $[Ca^{2+}]_i$ as well as activation of PKC.¹⁰⁴ Similar results have been described in pig endometrium cells stimulated with LH.¹⁰⁵ These signaling pathways have been implicated in the mechanisms that lead to sperm capacitation but very few studies have been undergone to study the effects of LH in this cell type.

Effects of Luteinizing Hormone on Sperm

Considering that LH is one of the reproductive hormones most markedly associated with the fertile window in women, once deposited in the female reproductive tract local LH may stimulate sperm fertilization ability. Early studies performed in

rabbits suggested that fertility could be enhanced when sperm were capacitated in uterus injected with up to 2000 μ g of LH.¹⁰⁶ However, it was until 2001 that LH direct effects on sperm function were investigated. In the human model, Eblen et al¹⁸ demonstrated that LH and hCG promoted PKA activity in sperm while PKC activity was not affected by neither of these hormones. Besides, hCG was able to increase cAMP levels in human sperm although LH was not tested. Based on these results, the investigators suggested that hCG or LH could mimic cAMP/PKA in sperm, since sperm LH/hCG receptors are functionally coupled to increasing cAMP production and activation of PKA. Stimulation of PKA activity of LH may be relevant since cAMP/PKA signaling pathway is involved in capacitation. Nevertheless, the undistinguishable use of LH and hCG based on their ability to bind to the same receptor may lead to some misinterpretations of the results. Despite of the promising results, no further investigations about the effect of LH on human or other mammal sperm physiology have been undergone, remaining as an unexplored variable of the capacitation process regulation demanding attention.

Conclusion

Sperm capacitation is a dynamic process required for gamete encountering and fertilization. The investigations discussed in this review point out that hormones present during the fertile window may modulate several sperm function variables involved in capacitation. Progesterone is the most extensively studied hormone regarding its effects on sperm, but evidences suggest that E2 and LH may also have a participation in sperm function modulation. Interestingly, E2 may negatively modulate some of the main effects induced by P4, suggesting that the simultaneous exposition to these hormones in the female reproductive tract may be the key for the fine regulation of the events that ultimately lead to a successful fertilization. As detailed here, the extent of these hormones effects on sperm function seems to be wide, but it must be considered that most of the investigations performed in the field evaluate sperm function variables as independent events though some of them are closely interrelated.

Sperm capacitation changes are mediated by several pathways and the evidences here discussed suggest that P4, E2, and LH may participate in some of them. However, the activation of these pathways (at least for steroid hormones) is regulated by hormone concentrations that promote different effects on sperm cells. Moreover, at a given concentration several pathways and processes may be activated. That is the case for micromolar concentrations of P4 that induce AR and motility changes while activating the PI3K-AKT and the PKC pathways. Under this condition, inhibition of PKC affected the P4-induced AR but inhibition of the PI3K-AKT pathway did not. Likewise, inhibition of the PI3K-AKT pathway only affected sperm motility.^{54,73} These observations indicate that each pathway is involved in different events, highlighting that capacitation comprises various biochemical and physiological changes regulated by complex mechanisms.

Despite the potential participation of E2 and LH in the events synchronization that culminates in a successful fertilization, they have not been subject of in depth studies. Perhaps, the undisputable success of assisted reproduction techniques have discourage the researchers to unveil the participation of these hormones in the fertilization process, but pursuing the investigations on the participation of P4, E2, and LH (either alone or in combination) in sperm capacitation will definitely contribute to the understanding of the fertilization in humans and may open the door to new approaches to elucidate some infertility issues that remains unresolved at the present time.

Authors' Note

ASLT revised the scientific literature, assisted in the selection of the key literature, and provided input during the writing. MC took the lead role in writing the paper from the concept to the final product. ASLT is recipient of a scholarship for post-graduate studies in the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) from CONACyT.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico), grant number 154923 to MC.

References

- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. 1952;170(4321):326.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951;168(4277):697-698.
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 2005;11(3):205-214.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(11):1017-1026.
- Wolf DE, Hagopian SS, Ishijima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol*. 1986;102(4):1372-1377.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil*. 1993;99(1):135-143.
- Lee MA, Storey BT. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod*. 1986;34(2):349-356.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*. 1995;171(2):554-563.
- Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(12):785-793.
- Saldivar-Hernandez A, Gonzalez-Gonzalez ME, Sanchez-Tusie A, et al. Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:99.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):503-510.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;160(2):828-833.
- Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*. 1992;152(2):304-314.
- Roldan ER, Murase T, Shi QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*. 1994;266(5190):1578-1581.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, et al (ed) *Physiology of Reproduction*. 1994;New York: Raven Press Ltd: 189-317.
- Mumford SL, Steiner AZ, Pollack AZ, et al. The utility of menstrual cycle length as an indicator of cumulative hormonal exposure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10):E1871-E1879.
- de los Santos MJ, Garcia-Laez V, Beltran-Torregrosa D, et al. Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1596-1605.
- Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2643-2648.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Bini L, et al. Characterization of membrane nongenomic receptors for progesterone in human spermatozoa. *Steroids*. 2002;67(6):505-509.
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Forti G. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;161(1-2):31-35.
- Calzada L, Bernal A, Loustaunau E. Effect of steroid hormones and capacitation on membrane potential of human spermatozoa. *Arch Androl*. 1988;21(2):121-128.
- Astle S, Slater DM, Thornton S. The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;108(2):177-181.
- Korach KS. Selected biochemical actions of ovarian hormones. *Environ Health Perspect*. 1981;38:39-45.
- Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and non-genomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett*. 2006;238(1):1-14.
- Coleman KM, Smith CL. Intracellular signaling pathways: non-genomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci*. 2001;6:D1379-D1391.
- Blackmore PF. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal*. 1993;5(5):531-538.

27. Harper CV, Cummerson JA, White MR, Publicover SJ, Johnson PM. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci.* 2008;121(pt 13):2130-2135.
28. Sosa CM, Pavarotti MA, Zanetti MN, Zoppino FC, De Blas GA, Mayorga LS. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(3):244-254.
29. de Lamirande E, Harakat A, Gagnon C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl.* 1998;19(2):215-225.
30. Uhler ML, Leung A, Chan SY, Wang C. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril.* 1992;58(6):1191-1198.
31. Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of Ca^{2+} oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem.* 2004;279(44):46315-46325.
32. Servin-Vences MR, Tatsu Y, Ando H, et al. A caged progesterone analog alters intracellular Ca^{2+} and flagellar bending in human sperm. *Reproduction.* 2012;144(1):101-109.
33. Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril.* 2006;86(3):745-749.
34. Calogero AE, Burrello N, Barone N, Palermo I, Grasso U, D'Agata R. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Hum Reprod.* 2000;15(suppl 1):28-45.
35. Francavilla F, Romano R, Santucci R, Macerola B, Ruvolo G, Francavilla S. Effect of human sperm exposure to progesterone on sperm-oocyte fusion and sperm-zona pellucida binding under various experimental conditions. *Int J Androl.* 2002;25(2):106-112.
36. Wu JT, Chiang KC, Cheng FP. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2006;93(1-2):34-45.
37. Aquila S, De Amicis F. Steroid receptors and their ligands: effects on male gamete functions. *Exp Cell Res.* 2014;328(2):303-313.
38. De Amicis F, Guido C, Perrotta I, et al. Conventional progesterone receptors (PR) B and PRA are expressed in human spermatozoa and may be involved in the pathophysiology of varicocele: a role for progesterone in metabolism. *Int J Androl.* 2010;34(5 pt 1):430-445.
39. Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, et al. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):877-885.
40. Tantibhedhyangkul J, Hawkins KC, Dai Q, et al. Expression of a mitochondrial progesterone receptor in human spermatozoa correlates with a progestin-dependent increase in mitochondrial membrane potential. *Andrology.* 2014;2(6):875-883.
41. Strunker T, Goodwin N, Brenker C, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature.* 2011;471(7338):382-386.
42. Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature.* 2011;471(7338):387-391.
43. Tesarik J, Moos J, Mendoza C. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology.* 1993;133(1):328-335.
44. Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem.* 1991;266(28):18655-18659.
45. Gatica LV, Guidobaldi HA, Montesinos MM, et al. Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(9):559-569.
46. Teves ME, Guidobaldi HA, Unates DR, et al. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One.* 2009;4(12):e8211.
47. Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta SK, Modi D. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012;35(5):633-644.
48. Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem.* 1990;265(3):1376-1380.
49. Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ. Biphasic elevation of Ca^{2+} in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol.* 2000;222(2):326-335.
50. Sumigama S, Mansell S, Miller M, et al. Progesterone accelerates the completion of sperm capacitation and activates CatSper channel in spermatozoa from the rhesus macaque. *Biol Reprod.* 2015;93(6):130.
51. Patrat C, Serres C, Jouannet P. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2000;62(5):1380-1386.
52. Turner KO, Meizel S. Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213(3):774-780.
53. Jaiswal BS, Conti M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10676-10681.
54. Parinaud J, Milhet P. Progesterone induces Ca^{++} -dependent 3',5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(4):1357-1360.
55. Sagare-Patil V, Vernekar M, Galvankar M, Modi D. Progesterone utilizes the PI3K-AKT pathway in human spermatozoa to regulate motility and hyperactivation but not acrosome reaction. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;374(1-2):82-91.
56. Qi H, Moran MM, Navarro B, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(4):1219-1223.
57. Sagare-Patil V, Modi D. Progesterone activates Janus Kinase 1/2 and activators of transcription 1 (JAK1-2/STAT1) pathway in human spermatozoa. *Andrologia.* 2013;45(4):178-86.
58. Varano G, Lombardi A, Cantini G, Forti G, Baldi E, Luconi M. Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not

- motility in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2652-2662.
59. Zimmer RK, Riffell JA. Sperm chemotaxis, fluid shear, and the evolution of sexual reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(32):13200-13205.
60. Chang H, Suarez SS. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod.* 2010;83(4):507-513.
61. Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod.* 2008;23(10):2339-2345.
62. Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, Anastasia A, Giojalas LC. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One.* 2008;3(8):e3040.
63. Chang H, Kim BJ, Kim YS, Suarez SS, Wu M. Different migration patterns of sea urchin and mouse sperm revealed by a microfluidic chemotaxis device. *PLoS One.* 2013;8(4):e60587.
64. Hereng TH, Elgstoen KB, Cederkvist FH, et al. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3249-3263.
65. Williams AC, Ford WC. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl.* 2001;22(4):680-695.
66. Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod.* 1998;59(4):733-742.
67. Therien I, Manjunath P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 2003;69(4):1408-1415.
68. Herrero MB, Cebal E, Franchi A, Motta A, Gimeno MF. Progesterone enhances prostaglandin E2 production via interaction with nitric oxide in the mouse acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(2):324-328.
69. Chen WY, Yuan YY, Shi QX, Zhang XY. Effect of protein kinase C on guinea pig sperm acrosome reaction induced by progesterone. *Acta Pharmacol Sin.* 2000;21(9):787-791.
70. Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, et al. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(8):722-727.
71. Harrison DA, Carr DW, Meizel S. Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod.* 2000;62(3):811-820.
72. O'Toole CM, Roldan ER, Fraser LR. Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(12):921-927.
73. Bonaccorsi L, Krausz C, Pecchioli P, Forti G, Baldi E. Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(3):259-268.
74. O'Toole CM, Roldan ER, Fraser LR. Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1996;45(2):204-211.
75. Chang MC. Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special references to the reproductive phases of the female. *Endocrinology.* 1958;63(5):619-628.
76. Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(5):1670-1678.
77. Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;80(4-5):369-381.
78. Aquila S, Sisci D, Gentile M, et al. Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1443-1451.
79. Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3481-3487.
80. Guido C, Perrotta I, Panza S, et al. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ERalpha) and estrogen receptor beta (ERbeta) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3403-3412.
81. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(10):477-482.
82. Wang C, Liu Y, Cao JM. G protein-coupled receptors: extracellular mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):15412-15425.
83. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(12):715-726.
84. Lucas TF, Royer C, Siu ER, Lazari MF, Porto CS. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. *Biol Reprod.* 2010;83(2):307-317.
85. Chimento A, Sirianni R, Zolea F, et al. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int J Androl.* 2011;34(5 pt 1):420-429.
86. Martinez-Traverso GB, Pearl CA. Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:48.
87. Arkoun B, Gautier C, Delalande C, et al. Stallion spermatozoa: putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *General and comparative endocrinology.* 2014;200:35-43.
88. Idaomar M, Guerin JF, Lornage J, Czyba JC. Stimulation of motility and energy metabolism of spermatozoa from asthenozoospermic patients by 17 beta-estradiol. *Arch Androl.* 1989;22(3):197-202.
89. Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, Lam EW. Steroid receptor action. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2):265-283.

90. Fujinoki M. Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by estrogen. *Reproduction*. 2010;140(3):453-464.
91. Francavilla F, Romano R, Pandolfi C, et al. Evaluation of the effect of 17alphaOH-progesterone and 17beta-oestradiol on human sperm ability to fuse with oocytes: comparison and possible interference with the effect of progesterone. *Int J Androl*. 2003;26(6):342-347.
92. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Ando S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology*. 2005;146(2):552-557.
93. Vigil P, Toro A, Godoy A. Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*. 2008;40(3):146-151.
94. Rossato M, Ferigo M, Galeazzi C, Foresta C. Estradiol inhibits the effects of extracellular ATP in human sperm by a non genomic mechanism of action. *Purinergic Signal*. 2005;1(4):369-375.
95. Boland R, Vasconsuelo A, Milanesi L, Ronda AC, de Boland AR. 17beta-estradiol signaling in skeletal muscle cells and its relationship to apoptosis. *Steroids*. 2008;73(9-10):859-863.
96. Ezcurra D, Humaidan P. A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:95.
97. Minegishi T, Nakamura K, Ibuki Y. Structure and regulation of LH/CG receptor. *Endocrine J*. 1993;40(3):275-287.
98. Choi J, Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;383(1-2):203-213.
99. Casarini L, Lispi M, Longobardi S, et al. LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One*. 2012;7(10):e46682.
100. Ryu K, Lee H, Kim S, Beauchamp J, Tung CS, Isaacs NW, et al. Modulation of high affinity hormone binding. Human chorionic gonadotropin binding to the exodomain of the receptor is influenced by exoloop 2 of the receptor. *J Biol Chem*. 1998;273:6285-91.
101. Bukovsky A, Indrapichate K, Fujiwara H, et al. Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:46.
102. Hunzicker-Dunn MB, L. The stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-dependent protein kinases in luteinizing hormone action. In: Ascoli M, ed. *Luteinizing Hormone Action and Receptors*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985:57-134.
103. Marsh JM. The role of cyclic AMP in gonadal function. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1975;6:137-199.
104. Davis JS, Weakland LL, Farese RV, West LA. Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. *J Biol Chem*. 1987;262(18):8515-8521.
105. Stepien A, Ziecik AJ. Second messenger systems in the action of LH and oxytocin on porcine endometrial cells in vitro. *Theriogenology*. 2002;57(9):2217-2227.
106. Wettemann RP, Hafs HD. Sperm capacitation after injection of LH or HCG in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1970;133(3):1002-1005.

ANEXO 3.- MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADAS

Medio HTF:

KCl 4.69 mM, NaCl 97.8 mM, D-Glucosa 2.78 mM, CaCl₂ 2.04 mM, MgSO₄ 0.20 mM, KH₂PO₄ 0.37 mM, lactato de sodio 21.4 mM, piruvato de sodio 0.33 mM, NaHCO₃ 4.0 mM, HEPES 21.0 mM, Penicilina/Estreptomicina 0.25%, pH 7.4. Suplementado con HSA al 0.3 % y piruvato de sodio 0.33 mM

Medio HTF sin suplementar:

Misma formulación del HTF, sin suplementar con HSA al 0.3 % y piruvato de sodio 0.33 mM.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS):

0.01 M amortiguador de fosfatos, KCl 0.0027 M, NaCl 0.138 M, pH 7.4.

Solución amortiguadora desnaturizante para muestras de proteínas (4X):

Tris-HCl 2.4 M, SDS 8%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 8%, trazas de azul de bromofenol, pH 6.8.

Solución amortiguadora de Tris-HCl-Tween 20 (TBS-T):

Tris-HCl 0.001 M, NaCl 0.15 M, 0.1% Tween 20, pH 7.4.