



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**Cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular y en la
movilidad del espermatozoide de humano inducidos por
progesterona en fluidos de alta viscosidad**

T E S I S

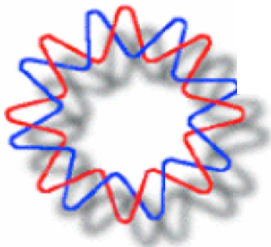
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

BIOL. MARTHA ROCÍO SERVÍN VENCES

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU**



Cuernavaca, Morelos

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

Índice	2
Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Abreviaturas	8
Resumen	10
I. Introducción	13
1. El óvulo	13
2. El espermatozoide	14
3. Los procesos generales de la fecundación	17
4. Procesos esenciales del espermatozoide de mamífero en la fecundación.....	17
4.1 La capacitación.....	18
4.2 La modulación de la movilidad	18
4.3 La reacción acrosomal	20
5. Importancia de los flujos iónicos en el espermatozoide	21
5.1 Flujos de calcio	21
II. Antecedentes.....	23
1. La fecundación en los mamíferos	23
2. Importancia de la progesterona en la fisiología del espermatozoide.	24
3. Efecto de la progesterona en el espermatozoide de humano	25
4. Vía de señalización de la progesterona en espermatozoide de humano	27
5. Viscosidad y modulación de la movilidad	28
6. La relación del Ca ²⁺ con la movilidad del espermatozoide y cómo medirla.	30
III. Hipótesis	34
IV. Objetivos	34
1. Objetivo general	34
2. Objetivos específicos	34
IV. Materiales y Métodos	35
1. Medios y reactivos	35

2. Material biológico	37
2.1 Obtención de la muestra.....	37
2.2 Obtención de espermatozoides móviles por la técnica de “swim-up”.....	37
3. Determinación de la viscosidad	38
4. Incorporación del colorante Fluo-3 AM en espermatozoides de humano	39
5. Microscopía de epifluorescencia	39
5.1 Sistema de microscopía.....	39
5.2 Adquisición de imágenes de espermatozoides nadando.....	40
5.3 Adquisición de imágenes de células pegadas por la cabeza y con el flagelo en movimiento	41
5.3.1 Dinámica del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano.....	41
5.3.2 Actividad basal de P3 en células individuales	42
6. Procesamiento de imágenes	42
6.1 Células pegadas.....	42
6.2 Espermatozoides nadando en metilcelulosa 400 cP	44
6.2.1 Obtención de la intensidad de fluorescencia, velocidad y trayectoria de espermatozoides nadando determinada con el programa Bohboh 4.42	44
7. Métodos de apéndices	44
7.1 Velocidad de espermatozoides nadando en medios viscosos determinados por microscopía y análisis de imágenes	44
7.2 Velocidad de espermatozoides nadando en medios viscosos determinados con el sistema CASA	45
V. Resultados y discusión	47
1. Caracterización reológica de las soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida	47
2. Fotoactivación de P3 con espermatozoides pegados por la cabeza	49
2.1 Análisis de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoide de humano.....	49
2.2 Análisis de la curvatura de los flagelos de espermatozoides de humano antes y después de la fotólisis de P3.....	54
4. Efecto de la progesterona sobre espermatozoides móviles en soluciones de alta viscosidad ..	59
4.1 Prueba de condiciones de fotoactivación de P3 en soluciones de alta viscosidad	59
4.2 Análisis cuantitativo de la respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides de humano nadando en una solución de alta viscosidad	61
4.2.1 Velocidad curvilínea de espermatozoides de humano nadando en un medio de metilcelulosa 400 cP ..	63
4.2.2 Cambio de fluorescencia en los espermatozoides nadando en un medio de metilcelulosa 400 cP	65
5. Actividad basal de P3 en células individuales	71
VI. Conclusiones	76
VII. Perspectivas	78

VIII. Apéndice.....	80
1. Velocidad curvilínea de los espermatozoide de humano nadando en soluciones de alta viscosidad medida por microscopía	80
2. Velocidad curvilínea de los espermatozoide de humano nadando en soluciones de alta viscosidad medida con el sistema CASA	83
VIII. Bibliografía.....	88

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del óvulo humano.....	13
Figura 2. Esquema de un espermatozoide de humano	14
Figura 3. Esquema de la estructura del axonema.....	16
Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero.....	16
Figura 5. Procesos generales de la fecundación.....	17
Figura 6. Patrones de movilidad en espermatozoide de mamífero.....	19
Figura 7. Progresión de la RA en espermatozoide de mamífero.....	20
Figura 8. Micrografía electrónica del cérvix humano.....	23
Figura 9. Esquema del aparato reproductor femenino.....	24
Figura 10. Estructura química de la progesterona.....	24
Figura 11. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a 3 μ M de progesterona.....	26
Figura 12. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un gradiente de progesterona (0-3 μ M) y movimiento flagelar.....	32
Figura 14. Actividad basal del análogo fotoactivable de progesterona P3.....	32
Figura 15. Recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de P3.....	33
Figura 16. Estructura química del colorante Fluo-3.....	36
Figura 17. Esquema del sistema de imágenes para detectar la fluorescencia en espermatozoides de humano.....	40
Figura 18. Parámetros cinemáticos utilizados en el sistema CASA.....	46
Figura 19. Incremento de la fluorescencia en espermatozoides de humano pegados por la cabeza y cargados con Fluo-3 en respuesta a la fotoactivación de P3 (en MEH, 2 mM de Ca^{2+}).....	50
Figura 20. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y en el flagelo de espermatozoides de humano.....	51
Figura 21. Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo del espermatozoide de humano de la Figura 18 en respuesta a la fotoactivación de P3.....	52
Figura 22. Variabilidad en el $t_{1/2}$ de la respuesta a P3 en los flagelos de espermatozoide de humano, divididos en segmentos de 5 μ m.....	52
Figura 23. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en cabeza y flagelo de espermatozoides de humano.....	53
Figura 24. Efecto de la fotoactivación de P3.....	55
Figura 25. Diferentes respuestas de los espermatozoides de humano a la fotoactivación de P3.....	56
Figura 26. Respuestas de espermatozoides de humano a la irradiación de luz UV (200 mseg) sin P3.....	57
Figura 27. Diferencia en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides incubados sin P3 y con P3.....	58

Figura 28. Imágenes de espermatozoides nadando libremente en una solución de 400 cP con fotoactivación de P3 (concentración final: 320 nM) en todo el campo	59
Figura 29. Imágenes de espermatozoides nadando en una solución que presenta una viscosidad de 400 cP con iluminación puntual de 1 seg para fotoactivar P3.	60
Figura 30. Imágenes de espermatozoides nadando libremente en una solución con una viscosidad de 400 cP con iluminación puntual continua para fotoactivar P3	60
Figura 31. Incremento de la fluorescencia en respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides de humano pegados por la cabeza en un medio de metilcelulosa	62
Figura 32. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados en respuesta a la fotoactivación P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP).....	65
Figura 33. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados al fotoactivar P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP)	66
Figura 35. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados al fotoactivación P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP).....	67
Figura 36. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados en respuesta al estímulo de luz UV en un medio de metilcelulosa (400 cP)	69
Figura 37. Células oscilando en respuesta a P3.....	72
Figura 38. Células con incremento gradual de Ca ²⁺ después de la adición de P3.....	72
Figura 39. Estructuras químicas de las progesteronas fotosensibles.....	75
Figura A1. VCL (µm/seg) de espermatozoides de humano capacitados nadando en soluciones de diferente viscosidad medidas por microscopía.	80
Figura A2. Distribución de frecuencias de las velocidades de nado de espermatozoides de humano en distintas soluciones viscosas medidas por microscopía.....	82
Figura A3. Distribución de frecuencias de la VCL de los espermatozoides capacitados en distintas soluciones viscosas medidas con el sistema CASA.....	84
Figura A4. Distribución de frecuencias de la VCL de los espermatozoides no capacitados en distintas soluciones viscosas medidas con el sistema CASA.....	85
Figura A5. Porcentaje de espermatozoides inmóviles detectados en el sistema CASA (nada por debajo de los 5 µm/seg).....	86

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio para el mantenimiento de espermatozoides de humano (MEH).....	35
Tabla 2. Resumen de la caracterización reológica de soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida disueltas en MEH con 2mM de Ca ²⁺	48
Tabla 3. Cambio de VCL de los espermatozoides al fotoactivar P3 (p ≤ 0.5).....	64
Tabla 4. Cambio de VCL de los espermatozoides al ser estimulados con un pulso de luz UV (200 mseg) en ausencia de P3 (p ≤ 0.5)	64
Tabla 5. Cambio de intensidad de fluorescencia de los espermatozoides	67
al fotoactivar P3.....	67
Tabla 6. Cambio de intensidad de fluorescencia de los espermatozoides al ser estimulados con un pulso de luz UV (200 mseg) en ausencia de P3.....	68
Tabla 7. Resumen de resultados de la actividad basal de P3 en células individuales	73
Tabla 8. Resumen de resultados de los patrones en la dinámica de la [Ca ²⁺] _i con P3 en células individuales	73
Tabla A1. VCL de espermatozoides nadando en soluciones de alta viscosidad (análisis de datos con ImageJ-MTrackJ)	81
Tabla A2. Análisis estadístico de la VCL de espermatozoides nadando en soluciones de alta viscosidad ...	81
Tabla A3. VCL de espermatozoides capacitados nadando en soluciones de alta.....	83
viscosidad (análisis de datos con sistema CASA).....	83

Abreviaturas

ZP: Zona Pelúcida
[Ca²⁺]_i: concentración de Calcio intracelular
nM: nanomolar
Ca²⁺: ion calcio
LED: light-emitting diode, por sus siglas en inglés
P3: análogo fotoactivable de progesterona con el Carbono 20 modificado con el grupo nitrobenzil
CatSper: canal catiónico del espermatozoide
seg: segundos
μM: micromolar
μm: micrómetros
μl: microlitros
tARN: ácido ribonucleico de transferencia
mARN: ácido ribonucleico mensajero
ARN: ácido ribonucleico
ADN: ácido desoxiribonucleico
RA: reacción acrosomal
ATP: adenosín trifosfato
pH: potencial de hidrógeno
pH_i: potencial de hidrógeno intracelular
HCO₃⁻: bicarbonato
BSA: albúmina sérica de bovino, por sus siglas en inglés
cP: centi Poise
K⁺: ion Potasio
Na⁺: ion Sodio
Cl⁻: ion Cloro
La³⁺: ion Lantano
Ni²⁺: ion Níquel
CO₂: bióxido de Carbono
Ca_v: canales de Calcio modulados por voltaje
mM: milimolar
ml: mililitros
mm: milímetros
min: minutos
mseg: milisegundos
nm: nanómetros
η: índice de flujo
k: índice de consistencia
τ: esfuerzo aplicado a un fluido
γ: velocidad de flujo
p: nivel de significancia estadística
GTP: guanosín trifosfato
ATPasa: adenosín trifosfato sintasa
CNG: canal modulado por nucleótido cíclico, por sus siglas en inglés
TRP: canal de receptor transitorio, por sus siglas en inglés
CC: canal cervical
PG: surcos primarios
SG: surcos secundarios
PGE: prostaglandina
PIP₂: fosfatidil inositol bifosfato

EGTA: ácido tetra acético etilen glicol-bis (β -aminoetil éter)
 I_{CatSper} : corriente del canal CatSper
mPR: receptor membranal de progestina
PGRMC1: componente 1 del receptor de progesterona membranal
PLC: fosfolipasa C
PKC: proteína cinasa C
3D: tres dimensiones
UV: ultravioleta
C20: Carbono 20
MEH: medio para el mantenimiento de espermatozoide de humano
DMSO: dimetilsulfóxido
 λ_{ex} : longitud de onda de excitación
 λ_{em} : longitud de onda de emisión
AM: acetoximetil éster
WHO: organización mundial de la salud, por sus siglas en inglés
CCD: "charge-coupled device"
ips: imágenes por segundo
F: fluorescencia en determinado momento
 F_0 : fluorescencia basal
 F_{max} : fluorescencia máxima
CASA: "computer-aided sperm analysis"
Hz: Hertz
VCL: velocidad curvilínea, por sus siglas en inglés
VSL: velocidad rectilínea, por sus siglas en inglés
VAP: velocidad de la trayectoria media, por sus siglas en inglés
ALH: desplazamiento lateral de la cabeza, por sus siglas en inglés
BFC: frecuencia del batido flagelar, por sus siglas en inglés
Lin: linealidad
Str: rectitud, por sus siglas en inglés
t/2: mitad del tiempo en llegar al punto máximo
ANOVA: análisis de varianza
cm: centímetros
N.S.: no significativo
ES: error estándar
DS: desviación estándar
N: número de repeticiones

Resumen

La fecundación es un evento de gran importancia para todos los organismos de reproducción sexual. En este proceso, el óvulo y el espermatozoide se fusionan para generar un nuevo individuo con carga genética diferente a la de los padres. Por su parte, el espermatozoide debe pasar por determinados cambios fisiológicos que le permitirán fecundar al óvulo. Uno de estos cambios tiene que ver con la movilidad, en el cual debe haber un cambio del estado activado al hiperactivado. La movilidad activada se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de amplitud pequeña (en medios acuosos). En cambio, la hiperactivada presenta un batido flagelar asimétrico y de amplitud grande (en medios acuosos), que se ha observado en espermatozoides recuperados del sitio de fecundación. Se ha propuesto que la movilidad hiperactivada le permite al espermatozoide nadar de manera progresiva en medios viscosos (como lo son el oviducto y las capas externas del óvulo) y atravesar tanto las células del *cumulus oophorus* como la Zona Pelúcida (ZP).

Con respecto a la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), se ha observado que en espermatozoides de hámster hiperactivados la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es mayor ($> 100 \text{ nM}$) que en los activados ($< 50 \text{ nM}$). Con espermatozoides de toro desmembrados (con detergente), se ha mostrado que una concentración de $\text{Ca}^{2+} > 200 \text{ nM}$ induce hiperactivación. Estos reportes indican que el Ca^{2+} es un factor fundamental para la inducción y el mantenimiento de la movilidad hiperactivada en los espermatozoide de mamífero. Sin embargo, no se ha logrado dilucidar cuál es el mecanismo fisiológico de la hiperactivación dentro del tracto reproductor femenino.

Por otro lado, la progesterona, una hormona secretada por las células que rodean al óvulo, es capaz de inducir un incremento en segundos en el contenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del espermatozoide de humano. Además, se ha propuesto que la progesterona es capaz de promover la movilidad hiperactivada y es posible que éste cambio en la movilidad sea mediado por el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La hipótesis de este trabajo es que el estímulo de progesterona incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y permite al espermatozoide nadar de manera progresiva en medios viscosos.

Para conocer la relación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la movilidad del espermatozoide de humano utilizamos técnicas de microscopía de fluorescencia. Observamos la respuesta tanto en la cabeza como en el flagelo de espermatozoides cargados con una sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} , denominada Fluo-3. Sin embargo, no es fácil de observar la fluorescencia de la cola, por lo que fue necesario conjuntar técnicas de microscopía de alta resolución temporal y espacial, con iluminación estroboscópica con LEDs y un análogo fotoactivable de

progesterona denominado P3. A pesar de que el compuesto P3 posee una actividad basal alta (~ 8 veces menor que la progesterona sin modificar), nos permite incrementar el Ca^{2+} intracelular, estimular a los espermatozoides sin perturbaciones en el medio y conocer el inicio preciso del estímulo.

En un principio, estudiamos la respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides de humano pegados por la cabeza (medio acuoso) tanto en la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como en la movilidad del flagelo. Ya se conocía bien el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la progesterona tanto en estudios con poblaciones como en la cabeza, observado en células individuales; sin embargo, no se ha reportado el comportamiento del incremento de Ca^{2+} en el flagelo ni la relación que existe con su movilidad. Nosotros abordamos este estudio y observamos que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por progesterona ocurre al mismo tiempo en la cabeza y en el flagelo; a diferencia de lo que se había observado en el espermatozoide de ratón, donde hay una onda de Ca^{2+} que se propaga desde la base de la cabeza hacia todo el cuerpo de la célula. La diferencia en la respuesta inducida por progesterona en el espermatozoide de humano y de ratón coincide con la diferencia en la activación del canal CatSper. También observamos que la curvatura del flagelo incrementa en respuesta a la progesterona, principalmente en la parte distal del flagelo.

Posteriormente, registramos la respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides nadando en metilcelulosa (medio viscoso). Los espermatozoides de humano nadan muy rápido, ~ 90 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (en el medio acuoso), por lo que atraviesan el campo visual en cuestión de segundos (~ 2 seg) y este tiempo no es suficiente para monitorear la respuesta antes y después de la fotoactivación de P3. Sin embargo, en un medio viscoso (metilcelulosa), la velocidad de los espermatozoides disminuyó hasta 34.4 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (± 7.8). Este decremento nos proporcionó una gran ventaja al permitirnos rastrear a los espermatozoides por más tiempo y así determinar su trayectoria y respuesta. En estos experimentos observamos diversos patrones en el cambio de intensidad de la fluorescencia de la cabeza, los cuales fueron muy diferentes a la respuesta clásica (observada en células pegadas y en población). Además, no nos fue posible conocer si las respuestas observadas realmente reflejaban el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o sólo eran artefactos generados por problemas técnicos, en particular, por cambios en el plano focal de los espermatozoides debido a su movimiento. Respecto a la movilidad, no observamos un cambio claro en la velocidad después de la fotoactivación de P3.

La diferencia en la respuesta a la fotoactivación de P3 en los espermatozoides nadando con respecto a los pegados, nos hizo re-evaluar la efectividad del compuesto P3 en el sistema de microscopía. Observamos que al añadir P3 (320 nM) a las células, el 65% presenta un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 27% comienzan a oscilar y 35% presenta un incremento gradual en el Ca^{2+} intracelular. Esto quiere decir que P3 cambia la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ antes de la fotoactivación, es decir que las células presentan una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ muy diferente

(alta, mediana, baja, con oscilaciones, etc.); a su vez, esta variabilidad modifica su capacidad de respuesta a la fotoactivación. Ahora bien, aunque las células son capaces de responder a la progesterona después de la fotólisis, no conocemos cómo es que el cambio en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ altera la modulación de la movilidad del flagelo.

En conclusión, debido al cambio en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la fotólisis, no observamos una respuesta clara en la movilidad de los espermatozoides, lo que nos indica que P3 no es un compuesto ideal para estudiar el efecto del Ca^{2+} en la movilidad del espermatozoide. Necesitamos otro análogo fotoactivable de progesterona con una actividad basal mucho más baja. Lo que nos permitirá realizar los experimentos con espermatozoides nadando en medios viscosos sin alterar la $[Ca^{2+}]_i$.

I. Introducción

La fecundación es un evento de gran importancia para todos los organismos de reproducción sexual. En este proceso, el gameto femenino (óvulo) y el gameto masculino (espermatozoide), se fusionan para generar un nuevo individuo con carga genética diferente a la de los padres (Yanagimachi, 1994).

1. El óvulo

La célula sexual femenina es el óvulo (**Figura 1**), la cual posee una gran cantidad de citoplasma, donde se encuentran proteínas, ribosomas, tARN, mARN, factores morfogenéticos y los todos los elementos necesarios para el desarrollo de un nuevo individuo (Gilbert, 2006).

El óvulo humano, que mide aproximadamente 100 μm de diámetro, posee un núcleo, nucleolo, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gránulos corticales (**Figura 1**) (Gilbert, 2006; Wassarman and Albertini, 1994). El óvulo está cubierto por una capa extracelular constituida de glicoproteínas llamada ZP y ésta a su vez se encuentra rodeada por una gran cantidad de células foliculares, denominadas células del *cumulus oophorus*, que a su vez forman la capa de la corona radiada.

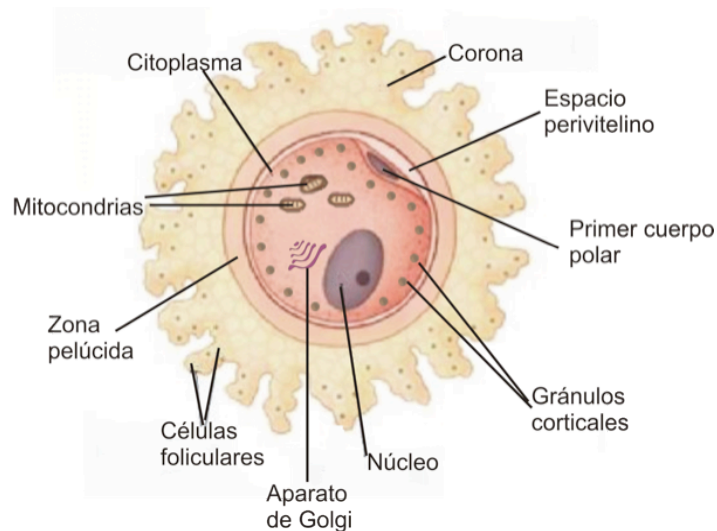


Figura 1. Esquema del óvulo humano. Se muestran los organelos celulares que componen al gameto femenino, así como las capas extracelulares que lo recubren, es decir, la ZP y las células foliculares.

Para que ocurra la fecundación el espermatozoide debe de atravesar las capas extracelulares del óvulo, es decir, las células del *cumulus oophorus* y la ZP. La ZP es una capa gruesa que recubre al óvulo y que se

encuentra formada por una serie de glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) y que son secretadas por los ovocitos en crecimiento. Esta capa persiste un poco después de la implantación del embrión (Gosden and Lee, 2010).

Por otro lado, el *cumulus oophorus* es una estructura formada por un conjunto de células que secretan una gran cantidad de matriz extracelular que es característica de mamíferos. Esta estructura posee diversas funciones, entre las que se encuentran: regular la maduración del óvulo (antes de la ovulación), conducir al ovocito hacia oviducto (durante la ovulación), recubrir al óvulo, producir hormonas y participar en una serie de mecanismos para permitir el acceso del espermatozoide al óvulo (después de la ovulación) (Gosden y Lee, 2010; Van Soom *et al.*, 2002). Además, el *cumulus oophorus* es una estructura dinámica que cambia dependiendo del ciclo menstrual. Antes del periodo ovulatorio se induce la síntesis de una extensa matriz extracelular. Esta matriz extracelular está constituida por células que secretan hialuronan, proteoglicanos, proteínas y hormonas. Además, las células del cumulus se comunican entre sí y con el óvulo por medio de uniones "gap". Gracias a estas uniones y a la matriz extracelular que secretan, las células del *cumulus oophorus* se pueden mantener unidas formando un sincicio (Gosden and Lee, 2010; Van Soom *et al.*, 2002).

2. El espermatozoide

La célula sexual masculina es el espermatozoide (**Figura 2**), el cual se constituye de manera general por la cabeza y el flagelo. Esto hace parecer que el espermatozoide es una célula simple, sin embargo, su forma y función son altamente especializadas para poder cumplir con su objetivo, llevar la información genética al ovulo, para así activarlo y comenzar el desarrollo de un nuevo organismo.

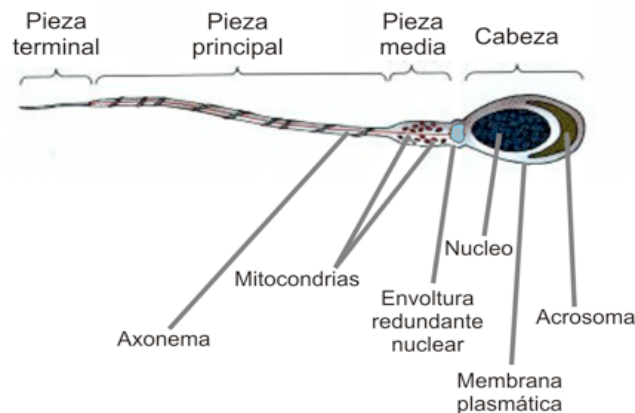


Figura 2. Esquema de un espermatozoide de humano. Se muestran los segmentos y organelos principales que constituyen al gameto masculino. Modificado de Gilbert, 2006.

En la cabeza (2-5 μm) se encuentra un núcleo haploide con ADN sumamente compacto. Por arriba del núcleo se encuentra la vesícula acrosomal o acrosoma, que contiene enzimas hidrolíticas y proteínas

importantes para la fusión y el reconocimiento con el óvulo. Debajo del núcleo, entre la unión de la pieza media con la cabeza, se encuentra la envoltura redundante nuclear, que es un conjunto de vesículas membranosas originadas a partir de la envoltura nuclear durante la espermiogénesis y es característica de mamíferos (Ho y Suarez, 2003). Debido a que el espermatozoide no tiene retículo endoplásmico se considera que la envoltura redundante nuclear, junto con el acrosoma, juegan un papel importante como reservorios de Ca^{2+} intracelular (Suarez, 2008b).

Por otro lado, el flagelo, cuya longitud varía dependiendo de la especie (entre 30-200 μm en espermatozoides de mamífero), está formado por el axonema, que es la maquinaria de propulsión para el espermatozoide. El axonema posee dos microtúbulos centrales (par central) rodeados por nueve dobletes de microtúbulos (estructuras en color azul numeradas del 1 al 9 de la **Figura 3**), lo cuales se encuentran asociados a las dineínas (estructuras en color negro y rojo, **Figura 3**). Las dineínas son ATPasas y motores moleculares (como la miosina y la cinesina en las fibras musculares) que producen la fuerza motriz que impulsa al flagelo. Cada uno de los dobletes externos de microtúbulos está conectado entre sí por otras proteínas denominadas nexinas. Además, los microtúbulos externos presentan una serie de proyecciones hacia el par central de microtúbulos denominadas conexiones radiales (“radial spokes”, estructuras en color verde de la **Figura 3**) (Lindemann and Lesich, 2010). A su vez, el par central de microtúbulos interactúa por medio de unas proyecciones (“central pair projection”, estructuras en color amarillo de la **Figura 3**) con los microtúbulos externos (Lindemann y Lesich, 2010). También, las conexiones radiales están ancladas en los dobletes de los microtúbulos externos con el complejo regulatorio de dineínas (“dynein regulatory complex”, estructuras en color anaranjado de la **Figura 3**), el cual está en contacto con los brazos internos de las dineínas. Así, toda la estructura del axonema se tiene comunicación entre sí por medio de todas las proteínas que forman uniones entre las diferentes estructuras del axonema. Es importante mencionar que tanto las conexiones radiales como el complejo regulatorio de dineínas se conforman de proteínas de unión a Ca^{2+} , tales como la centrina (en el complejo regulatorio de dineínas) y la calmodulina (en las conexiones radiales). Por lo tanto la concentración de Ca^{2+} intracelular es muy importante para que los flagelos puedan cambiar su patrón de batido (Ho y Suarez, 2001; Lindemann y Lesich, 2010).

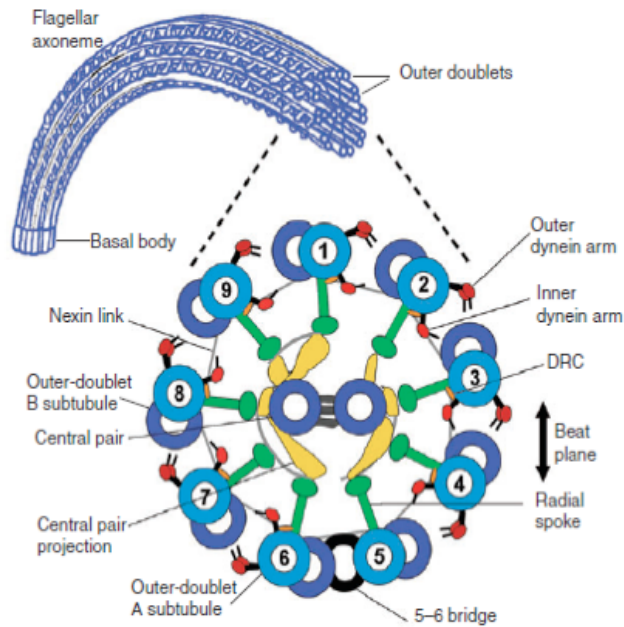


Figura 3. Esquema de la estructura del axonema. En la parte superior se encuentra un axonema, debajo de éste se representa el mismo en un corte transversal en el cual se pueden observar los complejos proteicos que componen a esta estructura y con las proteínas con las que están interactuando. También se puede observar el arreglo de los microtúbulos tipo “9+2”. Tomado de Lindemann and Lesich, 2010.

Por otro lado, el flagelo del espermatozoide se divide en la pieza media, la pieza principal y la pieza final (**Figura 2 y 4**). En la pieza media y en la pieza principal, el axonema está rodeado por la vaina fibrosa. En la pieza media, la vaina está rodeada por mitocondrias en un arreglo en espiral que es característico en mamíferos. En la pieza principal ya no hay mitocondrias, en lugar de éstas, la fibra densa externa se encuentra rodeando a la vaina fibrosa (**Figura 4**); sin embargo, en la pieza terminal no se encuentran estos tipos de citoesqueleto, ni mitocondrias, sólo el axonema (**Figura 4**) (Eddy *et al.*, 2003).

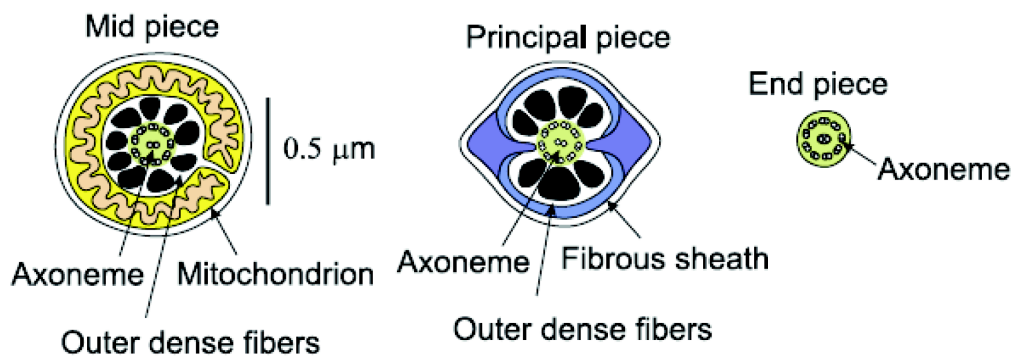


Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero. El flagelo se subdivide en pieza media, pieza principal y final. En el esquema se muestra un corte transversal de la pieza media donde se encuentra el axonema, la fibra densa externa y las mitocondrias en un arreglo en espiral, que es particular en mamíferos. En la pieza principal se encuentra el axonema, la fibra densa externa y la vaina fibrosa; en el esquema se puede observar el corte transversal de esta sección, mientras que en la pieza final solo se encuentra el axonema. Tomado de Darszon, 2011.

Otras características del espermatozoide es que posee muy poco citoplasma y no sintetiza proteínas ni ácidos nucleicos (Darszon *et al.*, 2005; Eddy y O'brian, 1994; Gilbert, 2006; Yanagimachi, 1994). A pesar de estas aparentes restricciones, el espermatozoide es capaz de fecundar al óvulo respondiendo de forma dinámica a los estímulos fisicoquímicos que encuentra dentro del tracto reproductor femenino.

3. Los procesos generales de la fecundación

La fecundación es un evento altamente regulado que involucra el reconocimiento entre ambos gametos y su ambiente. Se puede dividir en varios procesos particulares con relación al espermatozoide, éstos son: 1) Activación de la movilidad; 2) Quimiotaxis (en algunas especies); 3) Hiperactivación (en mamíferos); 4) Unión a la capa externa del óvulo; 5) Reacción acrosomal (RA); 6) Penetración a la capa externa del óvulo; 7) Fusión de las membranas plasmáticas entre el espermatozoide y el óvulo. Posteriormente ocurre la activación del óvulo (que incluye la reacción cortical, es decir, la exocitosis de los gránulos corticales) y la fusión de los pronúcleos (Figura 5).

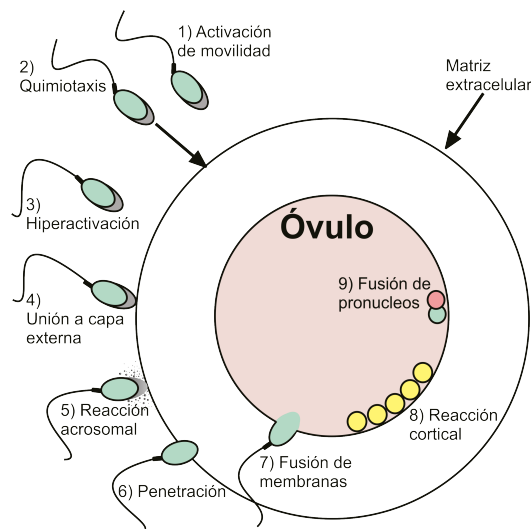


Figura 5. Procesos generales de la fecundación. Se muestran los pasos para una adecuada interacción entre el óvulo y el espermatozoide, y así lograr la fecundación. Este esquema es válido tanto para mamíferos como para otros organismos, aunque se pueden requerir otros procesos o carecer de ellos.

4. Procesos esenciales del espermatozoide de mamífero en la fecundación

El espermatozoide de mamífero recién eyaculado no es capaz de fecundar al óvulo, esta capacidad la adquiere después de pasar por una serie de cambios fisiológicos en el tracto reproductor femenino, tales como capacitación, modulación de la movilidad y la RA. En la regulación de estos eventos, los flujos iónicos juegan un papel fundamental. En particular, el espermatozoide posee una gran complejidad de los flujos de Ca^{2+} , los

cuales deben de estar finamente regulados en tiempo, en espacio y en concentración. Por ejemplo, en espacio el espermatozoide posee diversos compartimentos celulares que funcionan como reservorios de Ca^{2+} y dependiendo del tipo de estímulo se podrá liberar Ca^{2+} de unos reservorios o de otros provocando así distintas respuestas.

4.1 La capacitación

La capacitación es un fenómeno de maduración del espermatozoide de mamífero, con la cual adquiere la capacidad de fecundar al óvulo y ocurre dentro del tracto reproductor femenino. La capacitación engloba una serie compleja de eventos moleculares que aún no se han logrado dilucidar por completo. Algunos de los eventos ya identificados durante este proceso son: reorganización de la membrana plasmática, remoción de colesterol de la membrana plasmática (Visconti *et al.*, 2002), cambio en el estado de fosforilación de diversas proteínas, hiperpolarización de la membrana plasmática en espermatozoide de ratón, incremento en el pH intracelular (pH_i) (Darszon *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que los eventos ocurridos durante la capacitación son necesarios para la inducción de la RA y de la hiperactivación (Visconti *et al.*, 2002). Además, la capacitación puede ser reproducida *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contenga Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (Visconti *et al.*, 2002).

4.2 La modulación de la movilidad

Los espermatozoides de mamífero no tienen la capacidad de nadar cuando están en el testículo, esta propiedad la adquieren durante un proceso de maduración en el epidídimo y el movimiento comienza al momento de la eyaculación. Posteriormente, en el tracto reproductor femenino, el espermatozoide presenta dos tipos de movilidad: la activada y la hiperactivada. Ambos tipos de movilidad son importantes para el nado progresivo del espermatozoide en distintas regiones del tracto reproductor femenino (Suarez, 2008b; Suarez *et al.*, 1991).

La movilidad activada se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de amplitud corta (Darszon *et al.*, 2005; Suarez, 1996; Turner, 2006) (**Figura 6-A**). Al entrar al tracto reproductor femenino, este tipo de movilidad impulsa a los espermatozoides con un nado progresivo (Turner, 2006).

Por otro lado, se encuentra la movilidad hiperactivada que se ha observado en espermatozoides recuperados del oviducto, el sitio donde ocurre la fecundación. Cuando estos espermatozoides son colocados en un medio de baja viscosidad (~ 1 cP, como el agua), las células presentan una marcada asimetría y una mayor amplitud en el batido flagelar respecto a la observada en los espermatozoides activados (Ho y Suarez, 2001; Suarez, 1996; Suarez *et al.*, 1991). Estas características provocan que las células nadan de manera errática no progresiva o describiendo trayectorias en forma de “8” (Ho y Suarez, 2001; Suarez, 1996; Suarez *et al.*, 1991) (**Figura 6-B**). Sin embargo, este tipo de movilidad permite que el espermatozoidenade en un medio viscoso, como lo es el oviducto y la región cercana al óvulo, de manera progresiva (Ho y Suarez, 2003; Smith *et al.*, 2009) (**Figura 6-C**). También, se ha observado que la movilidad hiperactivada promueve la penetración del espermatozoide por la matriz extracelular de las células del *cumulus oophorus* y de la ZP (Stauss *et al.*, 1995; Ho y Suarez, 2001). Además, la hiperactivación puede tener otras funciones, por ejemplo, se ha observado que los espermatozoides se adhieren por la cabeza a una región del epitelio del oviducto denominada istmo y los espermatozoides hiperactivados son capaces de liberarse de esa región (Ho y Suarez, 2001). De hecho, la movilidad hiperactivada es necesaria para la migración por el tracto reproductor femenino, ya que ratones nulos en un canal necesario para la movilidad hiperactivada denominado canal catiónico del espermatozoide (CatSper) son incapaces de migrar para ascender por el oviducto (Ho *et al.*, 2009).

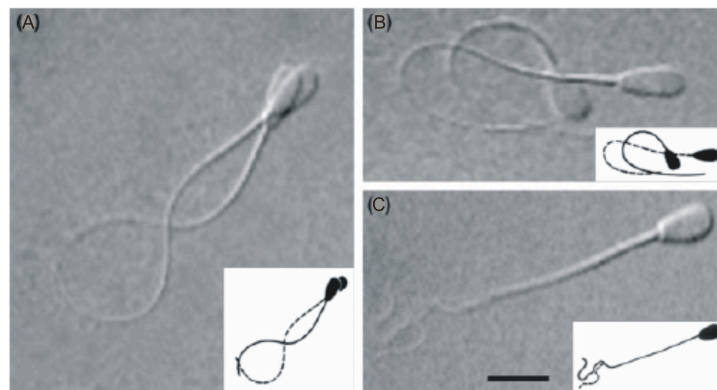


Figura 6. Patrones de movilidad en espermatozoide de mamífero (toro). En **A** se muestran dos imágenes superpuestas de un espermatozoide de toro con movilidad activada, en las cuales se observa el batido flagelar simétrico y de amplitud corta, característico de este tipo de movilidad. En **B** se muestra el batido flagelar asimétrico y de amplitud grande característico de un espermatozoide hiperactivado en una solución de baja viscosidad. En **C** se muestra un espermatozoide hiperactivado nadando en una solución viscoelástica (poliacrilamida) y se puede observar el cambio drástico en la forma del flagelo al compararlo con el espermatozoide de **B**. En los recuadros blancos se muestran representaciones gráficas de los espermatozoides de las imágenes de microscopía. Tomado de Ho y Suarez, 2001.

Es importante mencionar que el Ca^{2+} es un regulador fundamental tanto para el inicio como para el mantenimiento de la hiperactivación (Darszon *et al.*, 2006; Yanagimachi, 1994). Lo anterior se ha demostrado en espermatozoides de hámster y de toro desmembrados. En espermatozoides de hámster se demostró que la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es mayor en los espermatozoides hiperactivados (> 100 nM) que

en los activados (< 50 nM) (Suarez *et al.*, 1993). Además en espermatozoides de toro sin membrana (por tratamientos con detergente) se observó que una concentración mayor a 200 nM de Ca^{2+} inducen la hiperactivación (Ho *et al.*, 2002).

4.3 La reacción acrosomal

La RA es un evento esencial en la fecundación de mamíferos. Este proceso consiste en la exocitosis del contenido acrosomal. El acrosoma es una vesícula que cubre la parte anterior del núcleo y contiene enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina. En contraste con la exocitosis neuronal, la RA es un evento único. Además, en este proceso hay múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática. El resultado es la liberación del contenido acrosomal y la formación de vesículas híbridas formadas de la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (**Figura 7**) (Yanagimachi, 1994). Por lo anterior, después de la RA, la cabeza del espermatozoide se adelgaza y esto podría ayudar de manera mecánica a la penetración de la ZP. La RA cumple con dos funciones para la fecundación: facilitar la penetración del espermatozoide a través de la ZP y exponer la membrana interna del acrosoma, que posee sitios de reconocimiento para la fusión óvulo-espermatozoide (Harper *et al.*, 2008). Por estas razones, en los mamíferos la RA es un evento indispensable para la fecundación.

La RA se induce por la unión de distintos agonistas con su receptor. La ZP (Kirkman-Brown *et al.*, 2002; Wassarman, 2005) y la progesterona (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2002) estimulan la RA individualmente y son los inductores más estudiados hasta el momento. Además, se sabe que ambos agonistas aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunque las vías de señalización por las cuales se inicia la RA aún se están estudiando.

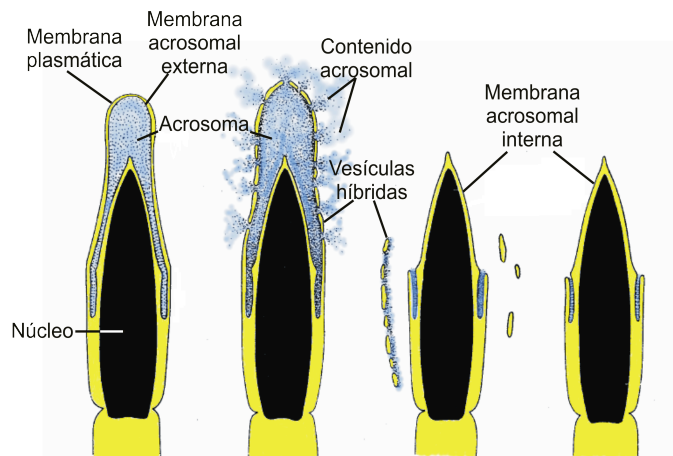


Figura 7. Progresión de la RA en espermatozoide de mamífero. Se muestra la cabeza y el acrosoma antes (1), durante (2) y después de la RA (3). Modificado de Yanagimachi, 1994.

5. Importancia de los flujos iónicos en el espermatozoide

Como ya se ha mencionado, el espermatozoide maduro no es capaz de sintetizar proteínas ni ácidos nucleicos, en cambio, posee la habilidad de responder a su ambiente de manera dinámica y efectiva gracias a que posee una gran variedad de canales iónicos, los cuales le permiten intercambiar información con su entorno de manera rápida y precisa por medio de flujos iónicos que son finamente regulados en tiempo y espacio. Estos flujos son el común denominador para que se lleven a cabo los procesos necesarios para la fecundación (como capacitación, RA y modulación de la movilidad).

Se sabe que la capacitación depende de Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , Na^+ y BSA, pero no se conocen las entidades moleculares que se encargan de regular el potencial de membrana, el pH_i y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que cambian durante este proceso *in vivo*. Sin embargo, se ha propuesto que la hiperpolarización que ocurre en la capacitación es necesaria para remover la inactivación de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Ca_v) tipo T, dejándolos así en un estado cerrado y listos para abrirse en respuesta a la ZP y poder inducir la RA (Darszon *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha propuesto que una clase particular de canales de Ca^{2+} , los de la familia CatSper, regulan la movilidad. De forma interesante, la expresión de éstos canales se ha reportado sólo en los testículos. Se propone que se forma un poro funcional del canal CatSper con 4 subunidades (genes) diferentes (CatSper1 al 4). Los ratones nulos de cualquier subunidad principal de los CatSper son infértiles debido a que no son capaces de hiperactivarse (Carlson *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2001). Además se han encontrado 3 subunidades auxiliares del canal: CatSper β , CatSper δ y CatSper γ (Chung *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009), las cuales se necesitan para la expresión y funcionamiento del canal.

5.1 Flujos de calcio

El Ca^{2+} es un segundo mensajero de gran importancia en la señalización celular y lo que ocurre en el espermatozoide no es una excepción, ya que el Ca^{2+} regula distintos procesos fundamentales en la fisiología del espermatozoide.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está regulada directamente por transportadores membranales, encontrados tanto en la membrana plasmática como en los organelos membranosos internos. En general, el citoplasma de las células en reposo contiene ~ 100 nM de Ca^{2+} "libre", mientras que del lado extracelular hay ~ 1 mM de Ca^{2+} , siendo miles de veces mayor a la concentración intracelular. Esta gran diferencia entre el lado extracelular e

intracelular se utiliza como fuerza motriz para eventos de señalización. Para generar y mantener el gradiente de Ca^{2+} las células poseen varias ATPasas e intercambiadores (como el de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) que se encargan de mover iones de Ca^{2+} en contra del gradiente (Darszon *et al.*, 2005).

En el espermatozoide de ratón y humano se ha demostrado la expresión de diversos canales de Ca^{2+} , que se encuentran localizados diferencialmente a lo largo del espermatozoide. Por ejemplo: los Ca_v , los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNG, por sus siglas en inglés), los canales de potencial transitorio (TRPs, por sus siglas en inglés), los CatSpers, entre otros. Lo anterior sugiere un enorme potencial del espermatozoide para responder a diversos estímulos fisicoquímicos modificando su permeabilidad a Ca^{2+} (Darszon *et al.*, 2005).

II. Antecedentes

1. La fecundación en los mamíferos

La fecundación en mamíferos es interna, es decir, se lleva a cabo dentro del tracto reproductor femenino, esta situación hace difícil conocer todos los eventos que ocurren durante este proceso *in vivo*. Además, el tracto reproductor femenino posee una morfología complicada, debido a que está formado por invaginaciones y microvellosidades en distintas regiones (**Figura 8**). Aunado a esto, el ambiente del tracto reproductor femenino cambia dinámicamente dependiendo de la fase del ciclo menstrual. Por otro lado, para contrarrestar todas estas dificultades, existen mecanismos de contracciones cervicouterinas, que ayudan al transporte de los espermatozoides desde la parte inicial del tracto reproductor femenino hasta el oviducto. Al llegar al istmo del oviducto (**Figura 9**), se cree que la movilidad del espermatozoide es la que tiene una mayor importancia para el desplazamiento del espermatozoide.

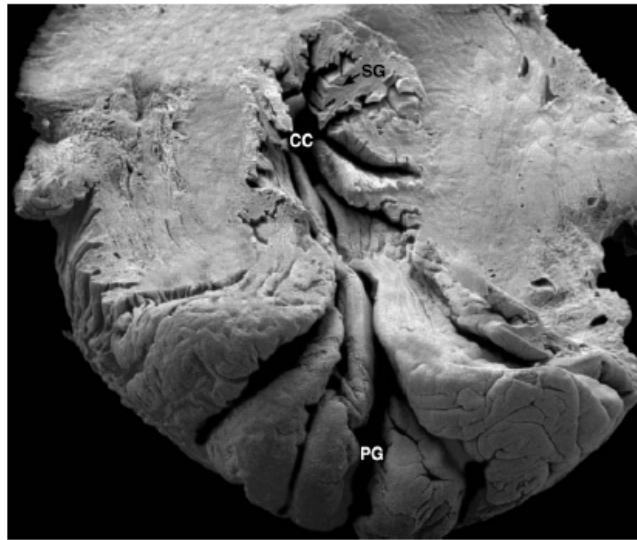


Figura 8. Micrografía electrónica del cérvix humano. En la imagen se puede observar el canal cervical (CC), que pueden ser cavidades por donde transita el espermatozoide. También se pueden observar los surcos primarios (PG, por sus siglas en inglés), que se conectan con el CC y se extienden hasta las partes más externas. También se pueden observar ramificaciones de los PG, que forman surcos más pequeños, denominados surcos secundarios (SG, por sus siglas en inglés). Aunque los SG parecen formar un patrón preferencial para el espermatozoide, no se sabe si los SG o hasta los terciarios puedan atrapar a los espermatozoides como ocurre en las criptas del cérvix. Tomado de Suarez y Pacey, 2006.

El *cumulus oophorus* se compone de células arregladas de manera radial y de la matriz que secretan (**Figura 1 y 9**). Estas células sintetizan y secretan progesterona, así como prostaglandinas (PGE1, PGE2 y PGF2 α) durante y después del periodo de ovulación (Osman *et al.*, 1989; Suarez, 1996; Thomas y Meizel, 1989; Yanagimachi, 1994; Tanii, 2011). Tanto la progesterona como las prostaglandinas (PGF1 α , PGE1, PGA1, PGE2) inducen aumento en la [Ca²⁺]_i en espermatozoide de humano (Lishko *et al.*, 2011; Strunker *et al.*, 2011).

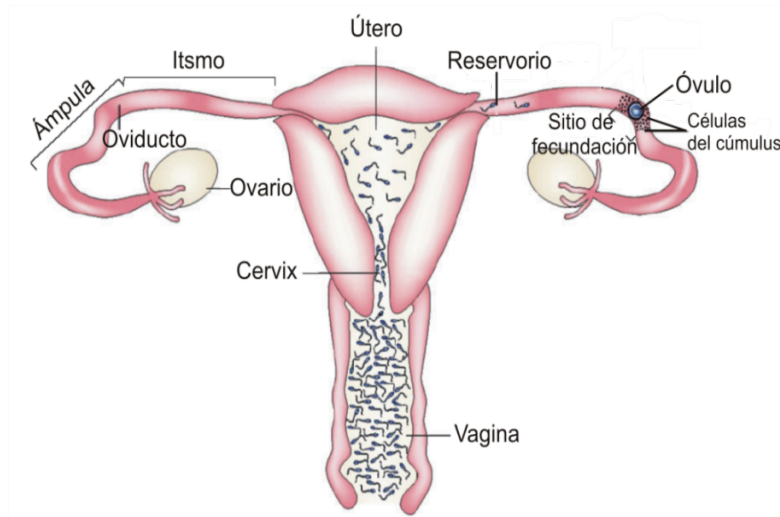


Figura 9. Esquema del aparato reproductor femenino. Se muestran las distintas regiones del sistema reproductor femenino, así como el lugar donde se encuentra el óvulo y las células del *cumulus oophorus*. Modificado de Kaupp et al., 2008.

2. Importancia de la progesterona en la fisiología del espermatozoide.

La progesterona (**Figura 10**) es una hormona esteroidea que posee una gran variedad de funciones y una de las más conocidas es la regulación del ciclo menstrual femenino. El mecanismo más estudiado de los efectos de esta hormona es la regulación de factores de transcripción a través de receptores citoplásmicos o nucleares en las células del cerebro, los cuales activan genes blanco y su efecto se lleva a cabo en horas (Brinton *et al.*, 2008; Conneely *et al.*, 2001). Además de activar la transcripción en neuronas, la progesterona induce respuestas fisiológicas en el espermatozoide de humano de manera rápida, tales como la modulación de la movilidad (Jaiswal *et al.*, 1999; Suarez *et al.*, 1991) y la RA (Blackmore *et al.*, 1990; Osman *et al.*, 1989). También se ha observado que en concentraciones picomolares la progesterona es un quimioatrayente para el espermatozoide de humano (Jaiswal *et al.*, 1999; Teves *et al.*, 2006) y de conejo (Guidobaldi *et al.*, 2008).

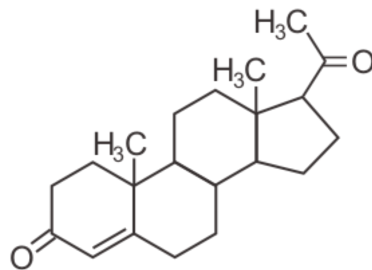


Figura 10. Estructura química de la progesterona.

Existe una gran cantidad de reportes sobre la expresión en el espermatozoide de receptores de moléculas bioactivas, como citocina, factores de crecimiento (factor de crecimiento epidermal y factor de crecimiento

tipo insulina I) y neurotransmisores (GABA_A, glicina, acetil colina) (Naz y Sellamuthu, 2006). Sin embargo, la relevancia fisiológica de estos factores no está muy clara debido a que no se conoce la concentración de cada molécula o si éstas se encuentran presentes en el sitio de la fecundación. Por otro lado, la progesterona fue identificada como el componente activo del fluido folicular humano que induce la RA (Osman *et al.*, 1989), y como se mencionó anteriormente, es secretada por las células del *cumulus oophorus* (**Figura 9**). Por lo tanto, se ha establecido que la progesterona es un ligando fisiológico de gran importancia para el espermatozoide de humano.

3. Efecto de la progesterona en el espermatozoide de humano

El efecto más estudiado de la progesterona en el espermatozoide es el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, que es una señal fundamental para la inducción de la RA y de la modulación de la movilidad. Además del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, la progesterona induce una depolarización en el potencial de membrana (Foresta *et al.*, 1993), salida de Cl⁻ de la célula (Turner y Meizel, 1995), entrada de Na⁺ (Foresta *et al.*, 1993), hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) (Thomas y Meizel, 1989) y fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas (Tesarik *et al.*, 1993).

A diferencia de los receptores de progesterona más estudiados (citoplásmicos), el espermatozoide de humano, posee otro tipo de receptor localizado en la membrana plasmática (Meizel y Turner, 1991), cuya identidad molecular aún no está muy clara. A través de este receptor, la progesterona induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de manera rápida (en segundos). Cuando se añade un estímulo de progesterona en concentración micromolar (generalmente 3 μM) se observa incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, el cual posee un componente transitorio, seguido de uno sostenido (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Kirkman-Brown *et al.*, 2000) (**Figura 11**). Este último puede presentarse en forma de oscilaciones en aproximadamente 10% de la población (Harper *et al.*, 2004). El aumento transitorio inicia en la zona ecuatorial de la cabeza (Meizel *et al.*, 1997) y en población se ha observado que este incremento tarda ~ 1 min en llegar al pico y disminuye en el mismo tiempo (Blackmore *et al.*, 1990; Harper *et al.*, 2003; Kirkman-Brown *et al.*, 2000) (**Figura 11**). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se elimina con bloqueadores de canales de Ca²⁺ como La³⁺ y Ni²⁺ (en concentración micromolar) (Blackmore, 1993; Blackmore *et al.*, 1990), así como removiendo todo el Ca²⁺ extracelular con un quelante de este ion, como EGTA (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Blackmore *et al.*, 1990). Lo anterior indica que la progesterona provoca la entrada de Ca²⁺ extracelular. Asociado al componente transitorio, existe un menor incremento correspondiente a Ca²⁺ liberado de pozas internas (Bedu-Addo *et al.*, 2007). Respecto al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ sostenido, éste dura más de 20 min (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2000) (**Figura 11**).

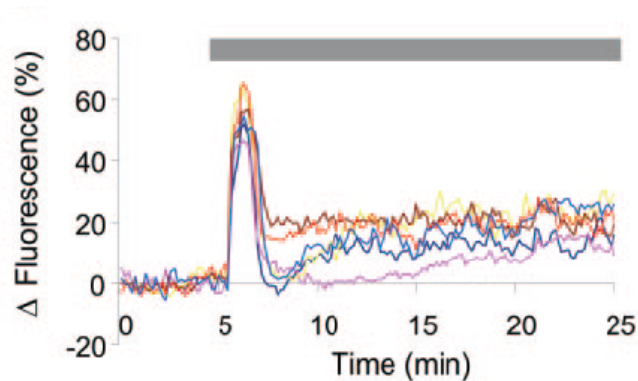


Figura 11. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a $3 \mu M$ de progesterona. Se observa el aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$, que comienza con la adición de progesterona (barra gris) seguido del incremento sostenido. Cada color indica el cambio de fluorescencia del indicador de Ca^{2+} en un espermatozoide de humano. Tomado de Harper *et al.*, 2004.

Recientemente se publicaron 2 artículos que proponen que el receptor de progesterona es el complejo que forma al canal CatSper (que incluye CatSper 1-4, CatSper- β , γ y δ). En uno de los trabajos se hicieron registros electrofisiológicos en la gota citoplásmica de espermatozoides de humano con las condiciones adecuadas (solución de la pipeta libre de iones divalentes) para aislar la corriente del canal CatSper (I_{CatSper}), adicionaron progesterona y observaron que la I_{CatSper} incrementaba. Además, esta corriente presentaba la misma dependencia de pH que el canal CatSper. También, cuando realizaron los mismos experimentos estimulando con progesterona y en ausencia de Ca^{2+} intracelular, ATP o GTP observaron la activación del canal CatSper, lo que sugiere que los efectos de la progesterona no son mediados por proteínas G, cinasas o segundos mensajeros y que el canal CatSper es el receptor de la progesterona (Lishko *et al.*, 2011).

Actualmente no se conoce cuál de las proteínas dentro del complejo CatSper (CatSper 1-4, CatSper- β , γ y δ) funciona como receptor y no se descarta la posible participación de otras proteínas, como los receptores membranales de progestina (mPR- α , mPR- β , mPR- γ , mPR- δ , mPR- ϵ) o el componente 1 del receptor de progesterona membranal (PGRMC1). A pesar de la incógnita sobre la identidad molecular del receptor, lo que sí se comprobó es que CatSper media la entrada de Ca^{2+} inducida por progesterona en el espermatozoide de humano (Lishko *et al.*, 2011; Strunker *et al.*, 2011).

Por otra parte, cuando la progesterona se adiciona en forma de gradiente ($0-10 \mu M$), los espermatozoides responde de manera muy distinta comparando con el estímulo micromolar antes descrito. En el estímulo con el gradiente se produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en forma de rampa (**Figura 12**). Este aumento se detecta después de 1 min de comenzado el estímulo y llega a su máximo antes de terminar el gradiente. Posteriormente la $[Ca^{2+}]_i$ se estabiliza y comienza a decaer lentamente (Harper *et al.*, 2004). Este tipo de estímulo gradual induce oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en un porcentaje mayor de la población de espermatozoides ($\sim 30\%$), al compararse con la adición de $3 \mu M$ ($\sim 10\%$). Estas oscilaciones se han asociado a cambios en la

forma del batido flagelar, es decir el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ correlaciona con el incremento en el movimiento del flagelo (**Figura 12**) (Harper *et al.*, 2004). Sin embargo, las medidas de la $[Ca^{2+}]_i$ y del movimiento del flagelo no se pudieron realizar al mismo tiempo debido a las dificultades técnicas que implican esos experimentos, por esta razón los autores del artículo muestran primero los trazos de fluorescencia seguidos del movimiento del flagelo (**Figura 12**).

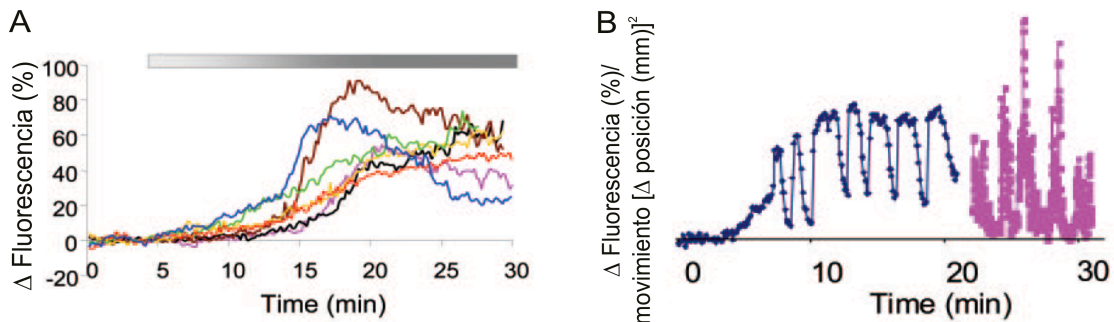


Figura 12. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un gradiente de progesterona (0-3 μ M) y movimiento flagelar. En **A**, se observa el aumento gradual de la $[Ca^{2+}]_i$ en distintas células, la respuesta fue inducida por la aplicación de progesterona en forma de gradiente (0-3 μ M, barra superior). Cada color representa la respuesta de un espermatozoide de humano diferente. En **B**, se muestra el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por un gradiente de progesterona (línea color azul) y la línea morada representa el batido flagelar de un espermatozoide; un aumento en la línea morada indica un incremento en la amplitud del batido, cuando se ve una depresión en la línea, una disminución en la amplitud. Modificado de Harper *et al.*, 2004.

4. Vía de señalización de la progesterona en espermatozoide de humano

En el espermatozoide de humano se han descrito dos tipos de receptores para progesterona: citoplásmicos y receptores de membrana plasmática (Losel *et al.*, 2005). Este último se encontró al conjugar progesterona con BSA, una molécula incapaz de atravesar la membrana plasmática. Aún con esta modificación la progesterona es capaz de inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en segundos y sin atravesar la membrana (Meizel y Turner, 1991).

A pesar del descubrimiento sobre la participación del complejo CatSper en la respuesta de progesterona en espermatozoide de humano, no se conoce la identidad molecular del receptor de progesterona (cual subunidad de CatSper) o si hay más de uno. Al considerar que se activa la vía de fosfolipasa C (PLC) y de la proteína cinasa C (PKC) al estimular con progesterona (Foresta *et al.*, 1995), no se puede descartar que otro tipo de proteína G pueda estar involucrada. En este contexto, los receptores de progesterona acoplados a proteínas G son posibles candidatos (Thomas *et al.*, 2009). Además, existen evidencias farmacológicas contradictorias (Blackmore y Eisoldt, 1999; Garcia y Meizel, 1999; Guzman-Grenfell y Gonzalez-Martinez, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2003), las cuales sugieren que la progesterona posiblemente activa más de una vía para

la entrada de Ca^{2+} aparte del CatSper. Es decir, inicialmente se propuso que un canal de Ca^{2+}_v tipo T podría ser el responsable de la entrada de Ca^{2+} en respuesta a progesterona (Garcia y Meizel, 1999). Sin embargo, en 1999 se encontraron evidencias que demuestran que el Ca_v tipo T no es el canal (Blackmore y Eisoldt, 1999) y en el año 2003, se encontró evidencia farmacológica que asocia al canal Ca_v tipo T con el componente sostenido del aumento de Ca^{2+} , así como en la RA (Kirkman-Brown *et al.*, 2003). Un año más tarde, se propuso que los canales de la familia TRP como otros candidatos para el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por progesterona (Guzman-Grenfell y Gonzalez-Martinez, 2004).

Como ya se mencionó, otro efecto que produce esta hormona es la entrada de Na^+ , la cual también puede ser responsable de la depolarización de membrana (Foresta *et al.*, 1995). Así mismo, el estímulo con progesterona induce la salida de Cl^- , mediado posiblemente a través de un canal de Cl^- tipo GABA_A (Meizel *et al.*, 1997; Sabeur *et al.*, 1996; Turner y Meizel, 1995; Wistrom y Meizel, 1993). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce el orden en que ocurren estos eventos.

A pesar de las intensivas investigaciones, hasta la fecha, no se ha logrado dilucidar toda la cascada de señalización inducida por progesterona que activa ya sea la RA y/o la hiperactivación. Por lo anterior es importante contar con nuevas herramientas que nos permitan analizar de manera más detallada los efectos inducidos por la progesterona en espermatozoide de humano; por ejemplo, la fluorimetría de mezclado rápido y los compuestos fotoactivables. Particularmente la progesterona fotoactivable sería de gran utilidad para dilucidar el papel de esta hormona en la movilidad del espermatozoide de humano. Es de gran ayuda utilizar los compuestos fotoactivables en microscopía y con células en movimiento porque es posible manipular el sitio y la forma de liberación de la molécula fotoactivable. Además, los compuestos fotoactivables son especialmente útiles cuando se requiere trabajar con células en movimiento, como los espermatozoides nadando, ya que sólo necesitamos irradiar una sección del campo visual para fotoactivar la molécula deseada sin crear perturbaciones en el medio, que ocasionen que las células se salgan del campo visual y del plano focal.

5. Viscosidad y modulación de la movilidad

Como ya se mencionó, el espermatozoide se encuentra ante un ambiente dinámico durante el tránsito por el tracto reproductor femenino. Una propiedad importante es la viscosidad, la cual cambia dependiendo del ciclo menstrual y de las distintas regiones en el tracto reproductor femenino. El espermatozoide debe ser capaz de continuar su camino aún en condiciones que restringen su movilidad, como lo es un incremento en la

viscosidad, tal como ocurre en la última región del oviducto, donde el espermatozoide debe nadar por la mucosa y atravesar la matriz del *cumulus oophorus* para lograr fecundar al óvulo. Tanto el mucus como la matriz extracelular del óvulo son regiones de alta viscosidad (mayor a 100 cP) (Suarez, 2008; Suarez y Dai, 1992). En humano, a la mitad del ciclo menstrual, es decir, en el periodo de ovulación, el mucus cervical presenta una viscosidad aproximadamente de 200 cP (este valor varía entre muestras en el periodo ovulatorio hasta en un orden de magnitud) (Smith *et al.*, 2009).

En trabajos previos se ha estudiado la hiperactivación en fluidos viscosos con espermatozoides de hámster y de ratón (Suarez y Dai, 1992; Suarez *et al.*, 1993), en los cuales se ha observado que los espermatozoides hiperactivados de estas especies pueden nadar de manera progresiva en fluidos viscosos (como metilcelulosa y poliacrilamida). Se sabe que el espermatozoide de hámster desarrolla la movilidad hiperactivada de manera muy estable en medios capacitantes sin utilizar algún fármaco en particular. Utilizando esta ventaja experimental para estudiar la hiperactivación con espermatozoide de hámster, se determinó que la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides hiperactivados es mas alta (~ 200 nM) que los activados (Suarez *et al.*, 1993). Además, se observaron oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, cuya frecuencia correlaciona con la frecuencia del batido flagelar (Suarez *et al.*, 1993). Estas oscilaciones las observaron en la cabeza y en la pieza principal del espermatozoide de hámster (Suarez *et al.*, 1993).

La mayoría de los estudios que se han realizado hasta ahora con espermatozoides de humano se hacen pegando a las células por la cabeza en fluidos con viscosidad similar al agua (~ 1 cP). En estos trabajos se ha observado que la progesterona tiene un efecto en la movilidad, ya que incrementa la amplitud del batido flagelar (Harper *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado el papel de la progesterona en espermatozoides de humano nadando en fluidos de alta viscosidad, debido a la dificultad técnica que implica el manejo del sistema, el rastreo de las células en las películas y el análisis de las imágenes. Aunque los primeros estudios en medios acuosos son importantes porque nos mostraron en una manera simplificada el efecto de la progesterona en los espermatozoides, no podemos descartar que las células pegadas a una laminilla es una condición muy diferente a la fisiológica, y las interacciones que se generan en esta condición (espermatozoides pegados en la laminilla) podrían inducir alguna respuesta en los espermatozoides. Por lo tanto es de gran importancia aceptar los retos técnicos para realizar experimentos con espermatozoides nadando en fluidos viscosos, lo cual nos permite acercarnos cada vez más al contexto fisiológico de la fecundación.

En una publicación reciente (Smith *et al.*, 2009) se cuantificaron distintos parámetros de la movilidad de espermatozoides de humano recién eyaculados en medios de alta viscosidad (≥ 4000 cP) sin inductores para la hiperactivación. Además, en este estudio observaron una población de espermatozoides que presenta un

movimiento en forma de rotación lateral (“rolling”). Este movimiento fue definido inicialmente en espermatozoide de ratón, donde se observó una rotación de $\sim 180^\circ$ alternando un lado y el otro sobre el eje principal del espermatozoide (Phillips, 1972), de manera que cuando se ven al microscopio con alta resolución temporal, las imágenes del espermatozoide rotando se pierden, ya que salen del plano focal debido a que la célula está en posición perpendicular al eje del espectador. En estos casos no es posible conocer la curvatura, la amplitud y la intensidad de fluorescencia del flagelo, etc. Por lo anterior, sería necesario el uso técnicas de microscopía más sofisticadas para conocer el movimiento en 3D, ya que hasta la fecha no existen este tipo de estudios con espermatozoides de humano.

Es importante mencionar que el espermatozoide de humano se encuentre en regiones donde pueda nadar en 3D (como el cérvix donde hay mucho espacio) y otras en donde no le sea posible debido a la morfología tan compleja del oviducto (por la gran cantidad de invaginaciones superpuestas entre sí) (**Figura 8**).

Retomando información mencionada anteriormente, en el oviducto, la movilidad hiperactivada es muy importante para que los espermatozoides puedan migrar hacia el óvulo y para que se puedan despegar del epitelio del oviducto al cual se adhieren durante su tránsito. Además, en las cercanías al óvulo, el espermatozoide tiene que atravesar las capas extracelulares (*cumulus oophorus* y ZP). En el caso de las células del cumulus, éstas poseen una matriz extracelular extensa y viscosa, por lo que el espermatozoide necesitará más fuerza para poder atravesarlas y así fecundar al óvulo. Este impulso es proporcionado por la movilidad hiperactivada.

6. La relación del Ca^{2+} con la movilidad del espermatozoide y cómo medirla.

Desde hace tiempo, se sabe que el Ca^{2+} es un factor de gran importancia para determinar la forma de flagelo del espermatozoide en varias especies. Hasta ahora, en espermatozoide de humano se ha utilizado microscopía de fluorescencia para medir la $[Ca^{2+}]_i$ sólo en la cabeza (las células se pegan por la cabeza y el flagelo tiene movimiento libre) (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 2004). No hay reportes en los que se mida la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo completo, principalmente por la dificultad técnica que implica su tamaño y su movimiento. Con técnicas convencionales, midiendo la $[Ca^{2+}]_i$ de la cabeza con fluorescencia y el movimiento del flagelo con microscopía de contraste de fases, se observó un cambio de movilidad en respuesta a la progesterona, específicamente, el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ correlaciona con un incremento en el desplazamiento lateral del flagelo (**Figura 12**) (Harper *et al.*, 2004).

En 1993, Suarez logró registrar la $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides de hámster nadando libremente utilizando una lámpara de xenón con iluminación estroboscópica, con lo que analizaron la relación entre la forma del flagelo y el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$. Con este estudio se demostró que la $[Ca^{2+}]_i$ es mayor en las células hiperactivadas (> 100 nM) respecto a las activadas (< 50 nM) y se registraron oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ sincronizadas con el batido flagelar (Suarez *et al.*, 1993). Además, con espermatozoides de toro desmembrados (con detergente), se demostró que una concentración de $Ca^{2+} > 200$ nM induce la movilidad hiperactivada (Ho *et al.*, 2002). Así pues, estos reportes indican que el Ca^{2+} es un factor fundamental para la inducción y el mantenimiento de la movilidad hiperactivada en espermatozoide de mamífero.

Posteriormente, Nishigaki (2006) utilizó iluminación estroboscópica con un diodo emisor de luz (LED, por sus siglas en inglés) para medir la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano. El uso del LED trae consigo ciertas ventajas, ya que requiere menos energía para su funcionamiento y no tiene la dificultad del manejo como la lámpara estroboscópica de xenón, que produce ruido electromagnético.

Para conocer el efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona en el batido flagelar, es necesario conjuntar técnicas de alta resolución temporal y espacial para así poder estudiar a los espermatozoides nadando. Lo anterior se puede lograr al utilizar las técnicas de microscopía de fluorescencia con iluminación estroboscópica con LEDs (diodos emisores de luz, por sus siglas en inglés) y el uso de compuestos fotoactivables. Estos compuestos son moléculas cuya actividad biológica está reducida debido a que poseen una(s) modificación(es) química(s) con un grupo fotosensible. Esta modificación se remueve cuando la molécula es irradiada con luz ultravioleta (UV) convirtiéndose así en una molécula biológicamente activa (Ellis-Davies, 2007; Mayer y Heckel, 2006). De hecho, los compuestos fotoactivables son de gran utilidad en estudios de células en movimiento, ya que no crean artefactos de movimiento, como sucede con la adición de compuestos directamente con la pipeta, lo cual provoca que las pequeñas turbulencias generadas al agregar los compuestos muevan la muestra biológica. Otra ventaja de los compuestos fotoactivables es que es posible conocer el momento justo de la activación con alta resolución temporal.

Actualmente, en nuestro laboratorio contamos con una progesterona fotoactivable (P3) (**Figura 13**), la cual tiene una actividad basal (la actividad que induce la molécula conjugada con el grupo fotosensible, es decir, antes de la fotoactivación) aproximadamente 8 veces menor que la progesterona sin modificar (**Figura 14**). P3 tiene una actividad basal relativamente alta y es difícil inducir un cambio grande en la concentración de progesterona por medio de la fotólisis. Sin embargo, es un compuesto fotoactivable útil ya que a pesar de la actividad basal, hay una recuperación en la $[Ca^{2+}]_i$ (33.12% por arriba de la basal, tomando como 100% la amplitud que se obtiene con 3 μ M de progesterona) (**Figura 15**) y después de la fotoactivación, la progesterona

liberada es capaz de inducir el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, tanto en experimentos en poblaciones celulares o utilizando células individuales, tal como lo hace la progesterona sin modificaciones (Servín-Vences, 2009).

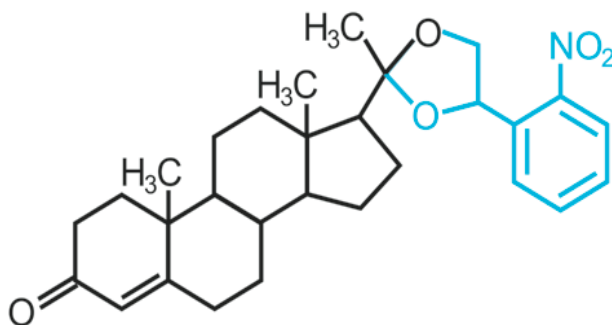


Figura 13. Estructura química del análogo fotoactivable de progesterona P3. El compuesto P3 posee una modificación en el carbono 20 con el grupo nitrobenzil, en azul, que es fotosensible.

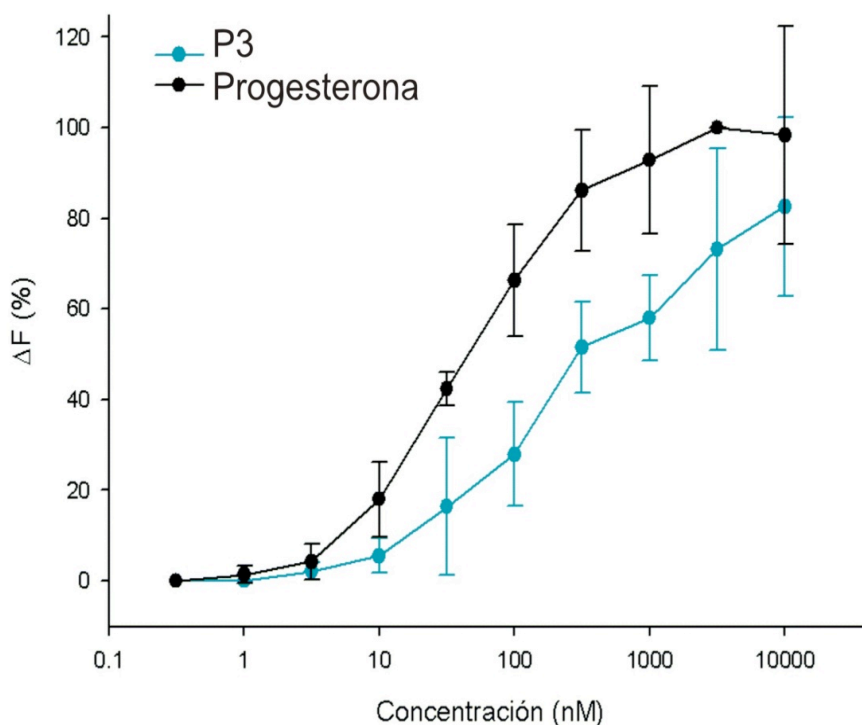


Figura 14. Actividad basal del análogo fotoactivable de progesterona P3. Se muestra la curva dosis-respuesta de la progesterona (en negro) y de P3 antes de la fotólisis (en azul). Se utilizaron espermatozoides de humano cargados con Fluo-3, los cuales se estimularon con distintas concentraciones de progesterona y P3. Con ~50 nM de progesterona se alcanza el 50% de la respuesta máxima. Con 420 nM se alcanza el 50% de la respuesta de P3 respecto a la de progesterona. En esta gráfica no hay ningún ajuste, los puntos solo están unidos entre sí. Tomado de Servín-Vences, 2009.

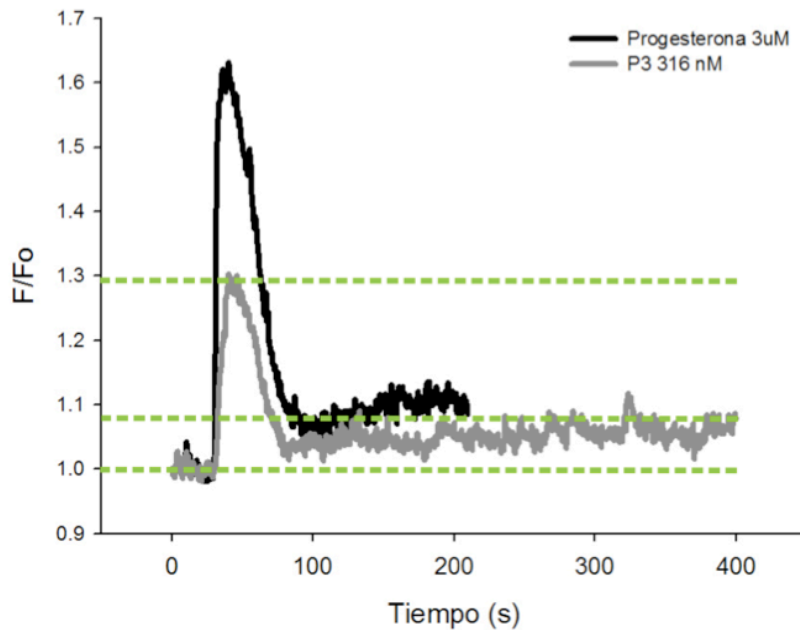


Figura 15. Recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de P3. En el esquema se observa un trazo representativo de la respuesta de espermatozoides de humano en población (en fluorómetro) cargados con Fluo-3 y su respuesta a la adición de una concentración de progesterona 3 μ M (en negro). En el trazo gris se muestra la respuesta de los espermatozoides en población a la adición de 316 nM de P3 (antes de la fotoactivación) y la recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ en el tiempo. La recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ después de 5 min de la adición de P3 (sin fotoactivar, es decir, la progesterona con el grupo nitrobenzil) es de 33.1% respecto al pico alcanzado con la adición de 3 μ M de progesterona (100%).

En el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, gracias al uso de un ligando fotoactivable y de los enfoques metodológicos antes mencionados, ya se ha logrado dilucidar el efecto de la $[Ca^{2+}]_i$ en la movilidad del flagelo. En este caso se observó que el ligando genera oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ produciendo así vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado progresivo (Wood *et al.*, 2007).

En este proyecto, se aplican el mismo tipo de técnicas que se han utilizado en el erizo de mar junto con las soluciones de alta viscosidad para estudiar el efecto de la progesterona en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la movilidad del espermatozoide de humano.

III. Hipótesis

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona modula la movilidad del espermatozoide de humano permitiendo así el nado progresivo en fluidos viscosos, como lo es el oviducto.

IV. Objetivos

1. *Objetivo general*

Caracterizar el efecto que induce la progesterona a nivel de $[Ca^{2+}]_i$ y de movimiento del espermatozoide de humano en una solución de alta viscosidad. Así como comparar los efectos de los espermatozoides pegados contra los espermatozoides nadando en fluidos viscosos.

2. *Objetivos específicos*

- Determinar el comportamiento reológico de las soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida donde nadarán los espermatozoides de humano.
- Analizar los efectos de la progesterona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la movilidad en espermatozoides de humano pegados por la cabeza utilizando un análogo fotoactivable de progesterona (P3). Determinar si hay alguna relación entre la movilidad y $[Ca^{2+}]_i$.
- Analizar los efectos de la progesterona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la movilidad en espermatozoides de humano nadando en soluciones viscosas al fotoactivar el análogo de progesterona P3. Determinar si hay alguna relación entre la movilidad y $[Ca^{2+}]_i$.
- Comparar las respuestas de los espermatozoides de humano pegados por la cabeza y nadando en fluidos viscosos.

IV. Materiales y Métodos

1. Medios y reactivos

Medio HAM F-10. (Sigma Aldrich, número de catálogo: N6013). Este medio se utilizó para la separación de los espermatozoides móviles y para la capacitación, en este caso suplementado con BSA y Ca^{2+} (2 mM final).

Medio para el mantenimiento de espermatozoides de humano (MEH). La composición del medio se muestra en la **Tabla 1**. La solución se ajustó a pH 7.4 con NaOH. Se utilizó MEH suplementado con 2 mM de Ca^{2+} para el mantenimiento de la muestra durante los registro en microscopía.

Tabla 1. Composición del medio para el mantenimiento de espermatozoides de humano (MEH)

Compuestos	Concentración final (mM)
NaCl	120
KCl	4
NaHCO ₃	15
MgCl ₂	1
HEPES	10
D-Glucosa	5
Piruvato de sodio	1
L-Lactato de sodio	10
CaCl ₂	0.3 ó 2

Progesterona. Grado laboratorio (Sigma). El “stock” se diluyó en DMSO; la solución se utilizó en una concentración final de 3 μM , diluida en MEH.

Fluo3-AM: (N-[2-[[[2-[bis(carboximetil)amino]-5-(2,7-dicloro-6-hidoxi-3-oxo-3H-xanten-9yl)-fenoxi]metil]oxi]-4-metil]-N-(carboximetil)acetoximetiléster) (Molecular Probes) (**Figura 16**); se diluyó en DMSO y se utilizó una concentración final de 2 μM .

El colorante Fluo-3 (**Figura 16**) es un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} (λ_{ex} : 505 nm; λ_{em} : 525 nm). La unión de este ión con el colorante incrementa la intensidad de la fluorescencia. $K_d = 390$ nM (Molecular Probes, 2005). La modificación con el grupo acetoximetil éster (AM) da como resultado una molécula no cargada que permite que el colorante permee por la membrana de las células. Una vez adentro de la célula, los grupos lipofílicos (los AM) son degradados por esterasas no específicas, que permiten que esta sonda fluorescente permanezca en el interior de la célula (Molecular-Probes, 2005; MolecularProbes, 2008).

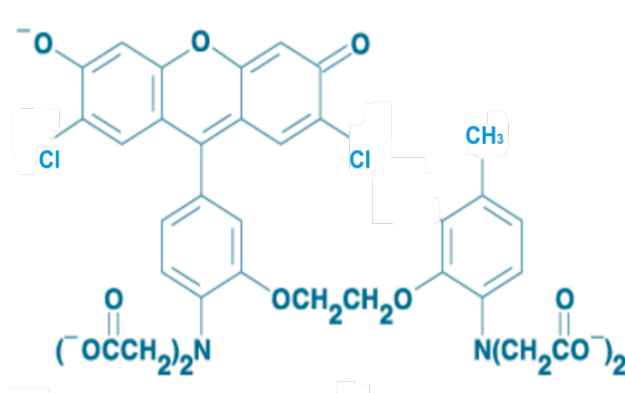


Figura 16. Estructura química del colorante Fluo-3 (λ_{ex} : 505 nm; λ_{em} : 525 nm).

Compuestos fotoactivables: la progesterona fotoactivable se obtuvo gracias a una colaboración con el grupo japonés del Dr. Yoshiro Tatsu en el AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japón). La progesterona se modificó químicamente en el carbono 20 con el grupo nitrobenzil, el cual posee una cetona como grupo funcional, requisito para que se lleve a cabo la reacción con el grupo fotosensible. A este compuesto se le denominó P3 (**Figura 13**) y se disolvió en DMSO y la preparación de las alícuotas se realizó en un cuarto semi-oscuro para evitar la fotólisis prematura de los compuestos.

Metilcelulosa: (Sigma Aldrich) todas las soluciones se prepararon al 2% partiendo de distintos frascos, cada uno con instrucciones para preparar fluidos con viscosidades específicas. Se utilizaron las soluciones con viscosidad de 400 cP, 1500 cP y 4000 cP (viscosidad reportada por la compañía a 20 °C, disueltas en agua y preparadas al 2%). Estas soluciones, clasificadas como viscosas, se disolvieron en agua destilada o MEH como lo indica el proveedor y posteriormente se registró su viscosidad.

Poliacrilamida: (Scientific Polymer Products) se utilizaron soluciones al 1%, 1.5% y 2%. Estas soluciones, clasificadas como viscoelásticas, se disolvieron en agua destilada o MEH y posteriormente se registró su viscosidad.

Poli-L-lisina: (Sigma Aldrich) la solución al 1% se diluyó 10 veces en agua destilada y se mantuvo en refrigeración.

Ionomicina: (Alomone) el “stock” se diluyó en DMSO, posteriormente se diluyó en MEH para alcanzar una concentración final de 10 μM .

2. Material biológico

2.1 Obtención de la muestra

En todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron muestras de espermatozoides eyaculados de donadores humanos, los individuos tenían dos días de abstinencia sexual como tiempo mínimo y siete días como máximo. Se verificó que las muestras (obtenidas por masturbación) cumplieran con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). Tales muestras fueron colectadas en un frasco de plástico estéril y se colocaron inmediatamente en una cámara húmeda a 37 °C, con 5% CO₂ durante 30 min. Con el tratamiento anterior se lograron deshacer los coágulos que posee el fluido seminal y así facilitar el procesamiento de la muestra, a este proceso se le conoce como licuefacción. En seguida se procedió con el protocolo de separación de los espermatozoides móviles de los no móviles por el método de “swim-up”, que se describe en la siguiente sección.

2.2 Obtención de espermatozoides móviles por la técnica de “swim-up”

El “swim-up” es un método en el cual se aprovecha la movilidad de los espermatozoides para su separación sin necesidad de utilizar químicos que estresen o afecten la viabilidad de las células o la estructura de la membrana plasmática. Este método está basado en la migración de los espermatozoides desde el fluido seminal a una fase superior con medio artificial en un tubo de ensayo (Makler, 1978). La técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Después de la licuefacción, se colocaron 300 µl de semen en un tubo de ensayo y muy lentamente se agregaron 700 µl de HAM-F10 (suplementado con 2 mM de Ca²⁺ y BSA para los espermatozoides capacitados y 300 µM de Ca²⁺ para los espermatozoides no capacitados). En este paso es muy importante que no se mezclen las fases.
2. Se colocó el tubo con una inclinación de 45° dentro de una gradilla y se incubó durante 1 hora dentro de una cámara húmeda a 37 °C y con 5% de CO₂.
3. Después de la incubación, se recuperaron 500 µl de la fase superior del tubo, se agregaron 500 µl mas de medio y se ajustó a la densidad deseada.

El ajuste de la densidad celular se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron 10 μl de la solución con espermatozoides y se colocaron en una cámara de Makler, la cual es una herramienta diseñada específicamente para calcular el número de espermatozoides contenidos en 1 ml de muestra. Esta cámara cuenta con un cubreobjetos cuadrículado (10 x 10 cuadros), de manera que el número de células contenido en 10 cuadros se multiplica por un factor de un millón, lo que permite calcular la cantidad final de células en 1 ml (Makler, 1978).

Para la capacitación, las células se ajustaron a una densidad de $10 \times 10^6/\text{ml}$, las cuales se dejaron incubando en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO_2 por 4 horas en un medio HAM-F10 suplementado con 2 mM de Ca^{2+} y 5% de BSA.

3. Determinación de la viscosidad

La viscosidad es una propiedad de los fluidos que indica la resistencia a la deformación. En este campo de estudio la viscosidad es importante porque sabemos que en el tracto reproductor femenino y en las secciones que rodean al óvulo la viscosidad del medio se incrementa. Esta propiedad de los fluidos es importante porque cambia las propiedades de nado de los espermatozoides como se puede observar en la **Figura 6**.

Para determinar la viscosidad de las soluciones de metilcelulosa y de poliacrilamida se utilizó un viscosímetro rotacional (AR1000 Advances Reometer, TA Instruments) en una configuración de cono (60 mm y 6°) y plato. En éstos, el cono tiene un movimiento rotacional que controla las velocidades rotacionales que sirven para deformar al fluido.

Se determinaron las características reológicas (de viscosidad) a diferentes valores de deformación de las soluciones de metilcelulosa (400 cP, 1500 cP y 4000 cP) y de poliacrilamida (1%, 1.5% y 2%). Posteriormente, se determinaron el índice de consistencia “ k ” y el índice del flujo “ η ”. “ k ” nos indica qué tan espesa o parecida a un sólido es una solución, mientras más grande este número, el material será mas parecido a un sólido. En cambio, la constante “ η ” nos dice si el fluido es “newtoniano” o “no-newtoniano”. Si “ η ” = 1, el fluido es “newtoniano”, si “ η ” \neq 1, el fluido es “no-newtoniano”. La caracterización se realizó de acuerdo a la ley de la potencia:

$$\tau = k \gamma^\eta$$

Donde “ τ ” es el esfuerzo aplicado; “ k ” y “ η ” son los índices mencionados anteriormente y “ γ ” es la velocidad de flujo.

Se realizó una comparación estadística de los diferentes valores de las muestras por medio de una ANOVA ($p \leq 0.5$).

4. Incorporación del colorante Fluo-3 AM en espermatozoides de humano

Después de la obtención de las células móviles o después de la capacitación, se adiciona el colorante Fluo-3 AM (concentración final 2 μM). Posteriormente se incuba la solución durante 30 min en una cámara húmeda a 37 °C y con 5% de CO_2 . Al terminar el tiempo de incubación las células se centrifugaron durante 5 min a 3,000 rpm para remover de la solución el colorante que no entró a las células. La pastilla obtenida se resuspendió en el mismo volumen (con MEH suplementado con 2 mM de Ca^{2+}). Esta solución se mantuvo a 37 °C hasta el término de los experimentos.

5. Microscopía de epifluorescencia

5.1 Sistema de microscopía

El microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Eclipse, TE300) cuenta con una cámara CCD (“charge-coupled device”, por sus siglas en inglés) de alta sensibilidad (DV887, Andor Ixon). La fuente de luz de excitación es un LED color cian (Lumileds Lighting LLC) conectado a un controlador estroboscópico y sincronizado con la cámara CCD. La fotoactivación se realiza utilizando una lámpara de Xenón (Uvico, Rapp Opto Electric) con un filtro en el rango de la luz UV (270-400 nm), la cual se encuentra conectada al sistema de iluminación del microscopio a través de un cable de fibra óptica (diámetro de 0.1mm ó 2 mm dependiendo del experimento). Para disparar la luz UV, se cuenta con un generador de pulsos (A.M.P.I.) que se encarga de controlar un obturador mecánico. El generador está conectado a la computadora y a la lámpara (**Figura 17**). Las células se mantienen a 37 °C con un controlador de temperatura (Medical System Corp, TC-202) junto con un calentador para objetivos (Warner Instruments, TC-124-A).

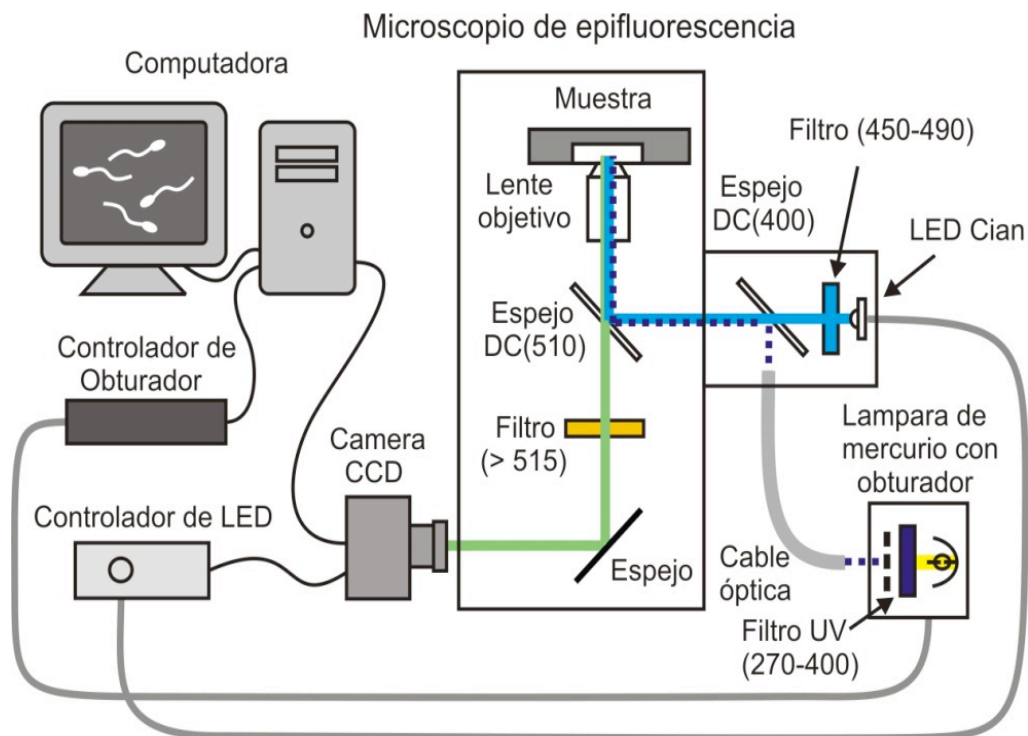


Figura 17. Esquema del sistema de imágenes para detectar la fluorescencia en espermatozoides de humano. El sistema de imágenes cuenta con un microscopio que está conectado a la cámara CCD y ésta a su vez está conectada a una computadora. El sistema de iluminación con LED está conectado a un controlador que a su vez está sincronizado con la cámara CCD. Se cuenta con los espejos y filtros necesarios para excitar y detectar la fluorescencia del colorante Fluo-3 que es sensible a la $[Ca^{2+}]_i$.

Las imágenes se colectaron con un objetivo 40 X (Nikon Plan Fluor, AN: 1.3, de aceite). En cuanto a la resolución espacial, en la mayoría de los experimentos se utilizó un “binning” de “2 x 2” (que corresponde a 256 x 256 pixeles que abarcan un campo de 200 x 200 μm), en caso contrario se indicará en cada sección, esta resolución se utilizó para incrementar la velocidad de adquisición de las imágenes y reducir el tamaño de los archivos. La velocidad de adquisición de imágenes fue distinta para cada caso, para el análisis de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la curvatura se registraron ~ 13 imágenes por segundo (ips), para las células nadando se utilizaron 15 y 50 ips. Asimismo, se estableció 1 mseg de exposición a la luz del LED para excitar al fluoróforo.

Los controles consistieron en irradiar con luz UV (100, 200 ó 500 mseg) a los espermatozoides previamente cargados con Fluo-3 sin adicionar P3 para descartar algún efecto de la irradiación de la luz UV.

5.2 Adquisición de imágenes de espermatozoides nadando

Para la observación de los espermatozoides nadando, las laminillas (diámetro de 25 mm) se trataron con poli-hema (0.1%) para evitar el pegado de las células a la superficie de la laminilla. Se agregó 50 μl de la solución de metilcelulosa o poliacrilamida a la laminilla y 10 μl de la solución de alta densidad de

espermatozoides (80×10^6 células). Posteriormente se colocó un cubreobjetos de menor tamaño (diámetro de 18 mm) encima de la mezcla de espermatozoides con la solución viscosa, para tratar de que los espermatozoides nadan en un plano y no se salgan de foco en el experimento. Se dejó estabilizar la muestra por 5-10 min para disminuir los flujos en la preparación y para que los espermatozoides se recuperen del incremento transitorio inducido por P3. En este punto se probaron diversas condiciones para observar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el posible cambio en movilidad. Las condiciones probadas se enlistan a continuación:

- Fotoactivar P3 en todo el campo durante 200 mseg, utilizando una fibra óptica gruesa (2 mm); duración de película de 1.5 min; y en una solución de 400 cP.
- Fotoactivar P3 en todo el campo durante 200 mseg, utilizando una fibra óptica gruesa (2 mm), película de 1.5 min y con la solución de 1500 cP.
- Fotoactivar P3 en todo el campo durante 200 mseg varias veces, utilizando una fibra óptica gruesa (2 mm), una película con duración de ~ 10 min y solución de 400 cP.
- Fotoactivación puntual 1 seg, utilizando una fibra óptica delgada (0.1 mm) con una película de ~ 1.5 min y metilcelulosa de 400 cP.
- Fotoactivación puntual continua, es decir, todo lo que duró la película utilizando una fibra óptica delgada (0.1 mm), película de ~ 1.5 min y metilcelulosa de 400 cP.

Cada condición tiene su control, el cual consistió en hacer el mismo tipo de experimento pero con la solución viscosa disuelta en MEH sin P3, para observar si sólo la irradiación con luz UV tiene algún efecto.

La condición que elegimos para los experimentos con células nadando, fue de fotoactivación en todo el campo visual durante 200 mseg con la fibra óptica gruesa (2 mm) en la solución de metilcelulosa con viscosidad de 400 cP. Estas células se rastrearon para determinar su velocidad curvilínea, su trayectoria y la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$.

5.3 Adquisición de imágenes de células pegadas por la cabeza y con el flagelo en movimiento

5.3.1 Dinámica del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano

Para la observación de los espermatozoides cargados con Fluo-3, primero se trataron las laminillas con poli-L-lisina (dilución 1:10 a partir de una alícuota al 1%), que permite que los espermatozoides se peguen por la

cabeza a la superficie de la laminilla. Se utilizó una densidad celular de $20 \times 10^6/\text{ml}$, esto es para que los espermatozoides queden suficientemente separados y no se sobrelapen entre sí, ya que eso dificulta el análisis de la fluorescencia. A las laminillas tratadas con poli-L-lisina se les agregó $10 \mu\text{l}$ de la solución de alta densidad de espermatozoides previamente cargados con Fluo-3.

Este experimento pretende determinar si el aumento en Ca^{2+} se propaga como onda (de cabeza a flagelo o viceversa) o es un evento que ocurre al mismo tiempo en toda la célula. Para esto, se utilizó un “binning” (resolución espacial) de “ 2×2 ” y de “ 4×4 ” para lograr observar al flagelo. La resolución temporal fue de 13 ips. Se siguió el mismo procedimiento del experimento anterior, excepto que se colocó un cubreobjetos encima de la muestra para tratar de restringir el movimiento del flagelo en el mismo plano focal.

5.3.2 Actividad basal de P3 en células individuales

Como ya se había mencionado, el compuesto fotoactivable P3 posee un actividad basal alta (**Figura 14**). En medidas realizadas en población se determinó que los espermatozoides se recuperan hasta llegar a 33.12% (± 13.6) por arriba de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (**Figura 15**), tomando como 100% la máxima amplitud que se obtiene con el estímulo de $3 \mu\text{M}$ de progesterona. Sin embargo, fue necesario determinar la actividad basal en células individuales. Esto se hizo con células pegadas como en los experimentos anteriores y se utilizó una densidad celular de $40 \times 10^6/\text{ml}$. Ya que las películas fueron largas, de 10 min, se utilizó una velocidad de adquisición baja, 1 ips. Se tomaron películas de los espermatozoides ya pegados y suspendidos en MEH. Primero se les adicionó P3 con una pipeta (concentración final 320 nM), se les dejó incubar por 5 min (el tiempo de recuperación que determinamos en estudios de población) y se dió un pulso de luz UV (500 msec) para fotoactivar P3. Después de 1 min, se agregó ionomicina, que es un ionóforo de Ca^{2+} (concentración final de $10 \mu\text{M}$) para obtener el máximo de fluorescencia y así poder compararlo con los otros incrementos en cada una de las células analizadas.

6. Procesamiento de imágenes

6.1 Células pegadas

El análisis del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la cabeza, flagelo completo y flagelo en diferentes regiones, se realizó con el programa Bohboh 3.42. Con este programa es posible conocer los valores de fluorescencia en la

cabeza y en distintas partes del flagelo. Los datos se exportaron al programa *Excel 2007* para la normalización que se realizó con la siguiente ecuación:

(Ecuación 1)

$$\frac{F/F_0}{F_{max}/F_0}$$

Donde **F** es el valor de fluorescencia en un momento dado; **F₀** es la fluorescencia basal (promedio de los valores de fluorescencia antes del estímulo) y **F_{max}** es el valor máximo de fluorescencia.

Los datos de fluorescencia obtenidos de la cabeza, flagelo completo y flagelo en diferentes regiones (entre 0-30 μm desde la cabeza, con intervalos de 5 μm) se normalizaron con la fórmula anterior, por lo que en cada caso se observó una F₀ diferente, de hecho, a medida que se tomaban valores más alejados de la cabeza, la F₀ tenía un valor más pequeño. Posteriormente, se determinó el t_½ (el tiempo donde se alcanza la mitad de la respuesta máxima) para la cabeza, para el flagelo completo y para cada región del flagelo (de 0 a 30 μm) y el resultado se comparó por medio de una prueba estadística (*t de Student* para cabeza y flagelo, y ANOVA para las distintas regiones del flagelo).

Para determinar la curvatura del flagelo se utilizó el programa Bohboh 3.42. Después de la adquisición de datos, se exportaron al programa SigmaPlot 10.0 para el análisis y para hacer la representación gráfica de éstos. Para el análisis de la curvatura del flagelo se determinó el valor absoluto de los datos y se realizó un promedio de estos valores en secciones de 5 μm durante un periodo de 3 seg. Los datos obtenidos del valor absoluto de la curvatura fueron comparados con una ANOVA. Decidimos utilizar el valor absoluto de los números porque al sacar el promedio de los valores con números positivos y negativos el promedio resulta subrepresentado.

Para analizar los datos obtenidos de los experimentos de actividad basal se utilizó el programa ImageJ para determinar los valores de fluorescencia de las cabezas de los espermatozoides. Los datos se exportaron al programa Excel 2007 para la normalización (**F/F₀**). Como ya se mencionó al final de estos experimentos se añadió ionomicina (10 μM) para obtener el máximo de fluorescencia, al cual se le asignó el 100% de incremento y se calculó el porcentaje de fluorescencia después de añadir progesterona, P3 o después de la fotoactivación.

6.2 Espermatozoides nadando en metilcelulosa 400 cP

6.2.1 Obtención de la intensidad de fluorescencia, velocidad y trayectoria de espermatozoides nadando determinada con el programa Bohboh 4.42

De cada experimento de microscopía de fluorescencia con espermatozoides nadando en metilcelulosa se eligieron las células que se procesarían con el programa Bohboh 4.32. Antes de analizar las imágenes, se observaron las películas y se eligieron las células que permanecen en foco antes y después de la fotoactivación, la mayoría de estas células nadaban en círculo (75%), aunque las células que nadan en círculo corresponden al 20% de la población total. Las cabezas de estas células se rastrearon de manera semiautomática. Al programa se le dan las características de la cabeza de la célula, es decir, la forma y el número aproximado de píxeles que componen a la cabeza.

Después del rastreo se pueden obtener distintos datos, como las coordenadas X-Y, que reflejan la posición de las células y la intensidad de fluorescencia. Con las coordenadas X-Y se puede obtener la trayectoria que siguieron las células durante el experimento, así como su velocidad. Puesto que sólo se tenían las coordenadas X-Y, se utilizó la fórmula para obtener la distancia entre dos puntos (**Ecuación 2**) y ese resultado se dividió entre el tiempo conocido que hay entre cada imagen.

(Ecuación 2)

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Donde "d" es la distancia entre dos puntos con coordenadas (x_1, y_1) y (x_2, y_2) .

7. Métodos de apéndices

7.1 Velocidad de espermatozoides nadando en medios viscosos determinados por microscopía y análisis de imágenes

Estos experimentos se llevaron a cabo para determinar la velocidad a la cual nadan los espermatozoides en metilcelulosa y en poliacrilamida. Se realizaron en campo claro con un objetivo 40 X y se tomaron ~ 50 ips, con esta resolución es posible distinguir todo el ciclo flagelar en todas las soluciones probadas. Todos estos experimentos se llevaron a cabo a 37 °C.

Para determinar la velocidad a la cual nadan los espermatozoides en las diferentes soluciones, se utilizó el “plugin” MTrackJ del programa ImageJ para rastrear a los espermatozoides y posteriormente determinar la velocidad. Lo que se obtiene con el programa después de rastrear las trayectorias son las coordenadas X-Y de la imagen, con las cuales es posible determinar la distancia recorrida entre dos puntos y posteriormente la velocidad.

7.2 Velocidad de espermatozoides nadando en medios viscosos determinados con el sistema CASA

El equipo CASA (“computer-aided sperm analysis”, por sus siglas en inglés) es un instrumento que nos permite conocer parámetros de movilidad (cinemáticos) de una población de espermatozoides. Este equipo rastrea la cabeza de los espermatozoides y reconstruye la trayectoria de éstos. Ya con las trayectorias reconstruidas, se calculan una serie de parámetros relacionados con el movimiento de las células.

El equipo CASA se compone de una video cámara, una computadora y un microscopio de contraste de fases. El software utilizado se encarga de identificar y seguir a los espermatozoides de las imágenes de video, así como realizar todos los cálculos para determinar los parámetros cinemáticos. El periodo de registro es de 4 seg/célula, el registro se hace con una frecuencia de 60 Hz. De hecho, para el espermatozoide de humano, la definición de movilidad hiperactivada sería: $VCL \pm 150 \mu\text{m}/\text{seg}$, $LIN \leq 50\%$ y $ALM_{\text{max}} \pm 7 \mu\text{m}$ (Mortimer, 2000).

Las trayectorias de las cabezas de los espermatozoides son reconstruidas y posteriormente se calcula una serie de parámetros cinemáticos que se enlistan a continuación:

- **Velocidad curvilínea** (VCL, por sus siglas en inglés): se refiere a la distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide dividido entre el tiempo de observación. Esta velocidad es la que siempre presentará el valor mas alto comparada con las otras (**Figura 18**).
- **Velocidad rectilínea** (VSL, por sus siglas en inglés): se determina tomando en cuenta la distancia de una línea recta trazada entre el primer y último punto de la trayectoria entre el periodo de observación. Este parámetro da la ganancia neta recorrida por la cabeza del espermatozoide. Este valor siempre es el más pequeño de las tres velocidades(**Figura 18**).
- **Velocidad de la trayectoria media** (VAP, por sus siglas en inglés): es el promedio de la distancia recorrida por el espermatozoide dividido entre el tiempo de observación. (**Figura 18**) Esta velocidad

puede resultar muy similar a la VSL en el caso de que las trayectorias de las células sean muy regulares o lineales, es decir, con poco movimiento lateral. En cambio, con trayectorias irregulares o cuando hay una gran desviación lateral de la cabeza la VAP será mucho mayor que la VSL.

- **Desplazamiento lateral de la cabeza** (ALH, por sus siglas en inglés): se refiere a la distancia en lo ancho del movimiento lateral de la cabeza, es decir, en un eje perpendicular al eje principal de la cabeza (**Figura 17**). Se calcula como la distancia total del movimiento lateral en el periodo de observación. Este valor es alto en los espermatozoides hiperactivados (Mortimer y Mortimer, 1990).
- **Frecuencia de batido flagelar** (BCF, por sus siglas en inglés): es el número de veces que la cabeza cruza la dirección del movimiento, está relacionada al desarrollo de otra onda de batido. La BCF es un valor estimado de cambios a *grosso modo* en el patrón del batido flagelar, y puede estar sesgado por la frecuencia de registro.

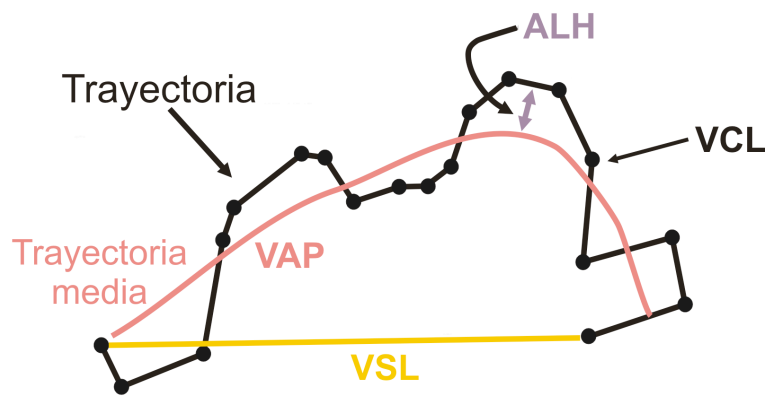


Figura 18. Parámetros cinemáticos utilizados en el sistema CASA. En la figura se representan los diferentes parámetros utilizados por el sistema CASA para caracterizar la movilidad de los espermatozoides. En negro esta la VCL, en morados la ALH, en rosa la VAP y en amarillo la VSL. Los parámetros mencionados anteriormente se encuentran descritos en el texto.

Además de los parámetros de velocidad, también se comparan los cocientes de los tres tipos de velocidades, esto porque la forma de las trayectorias influye los valores de velocidad. Estos parámetros son:

- **Linealidad** (Lin, por sus siglas en inglés): $(VSL/VCL) \times 100$
- **Rectitud** (Str, por sus siglas en inglés): $(VSL/VAP) \times 100$

Para la caracterización del movimiento de los espermatozoides capacitados y no capacitados en soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida (disueltas en MEH respectivamente) se compararon las frecuencias relativas de la VCL.

V. Resultados y discusión

Es este trabajo partimos de una hipótesis respaldada por una serie de antecedentes bien conocidos en espermatozoide de mamífero. Ya se había observado que existe una modulación de la movilidad del flagelo por oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por progesterona en espermatozoide de humano (Harper *et al.*, 2004). Además, en espermatozoide de hámster se observó que los espermatozoides hiperactivados nadan de manera mas progresiva que los espermatozoides activados en medios viscosos y que hay una relación entre la movilidad y las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide hiperactivados (Suarez *et al.*, 1993). Por lo anterior postulamos la siguiente hipótesis: El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona modula la movilidad del espermatozoide de humano permitiendo así el nado progresivo en fluidos viscosos, como lo es el oviducto.

El uso de medios viscosos es una condición cercana a la fisiológica, que además tiene ventajas experimentales. Es decir, los espermatozoides de animales marinos como de erizo de mar nadan en círculos cuando se encuentran en la interface de dos materiales, como las superficies del cubreobjetos, a este fenómeno se le denomina tigmotaxis. Este comportamiento permite observar cómo nadan las células bajo un microscopio por suficiente tiempo. En contraste, los espermatozoides de mamífero no presentan tigmotaxis y se salen del campo visual del microscopio rápidamente, lo cual nos hace difícil estudiar el comportamiento de las células. Un incremento de la viscosidad del medio reduce la velocidad de nado de los espermatozoides, lo que nos permite observar el comportamiento del espermatozoide por un tiempo más prolongado que con el medio de registro convencional (viscosidad similar al agua: ~ 1 cP).

Sin embargo, en el laboratorio no se había trabajado antes con medios viscosos ni viscoelásticos por lo que preparamos 6 diferentes medios usando metilcelulosa y poliacrilamida, de las cuales caracterizamos sus propiedades reológicas. También, en este trabajo se utilizó por primera vez la progesterona fotoactivable (P3) en el sistema de microscopía, por lo que antes de realizar los experimentos con espermatozoides móviles (sin pegarlos al cubreobjetos) debimos de estandarizar el uso de P3 en los estudios de microscopía, ya que la caracterización del compuesto se realizó únicamente en estudios con poblaciones de espermatozoides en el fluorómetro (Servín-Vences, 2009).

1. Caracterización reológica de las soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida

La viscosidad es una característica de los fluidos que indica el nivel de resistencia interna o fricción al desplazarlo o deformarlo. El valor de la viscosidad de un fluido dado puede ser constante o no cuando se

cambia la velocidad de desplazamiento (o de deformación). En caso de que el valor sea constante, el fluido se llama “newtoniano” y podemos describir la Viscosidad del fluido. En caso de que el valor no sea constante, es imposible definir la viscosidad del fluido sin definir la condición del desplazamiento. Las soluciones de metilcelulosa y de poliacrilamida son fluidos “no-newtonianos”, por lo que se utilizan otros parámetros para describir sus características reológicas, estos son: “ k ” y “ η ”.

El índice de consistencia o de viscosidad “ k ”, nos indica qué tan espesa o parecida a un sólido es una solución, mientras más grande es éste número, el material será mas parecido a un sólido.

En cambio, el índice “ η ” o índice de comportamiento de flujo, nos dice si el fluido es “newtoniano” o “no-newtoniano”. Si “ η ” = 1, el fluido es “newtoniano”, si “ η ” \neq 1, el fluido es “no-newtoniano”, particularmente, si “ η ” > 1, se produce un espesamiento al incrementar la velocidad de desplazamiento y el producto se le conoce como dilante; en cambio si “ η ” < 1 se produce un aclaramiento y al fluido se le conoce como pseudoplástico.

Los resultado de la caracterización reológica se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Resumen de la caracterización reológica de soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida disueltas en MEH con 2mM de Ca^{2+}

Solución	η	k
Metilcelulosa 400 cP	0.39	1.29
Metilcelulosa 1500 cP	0.40	3.04
Metilcelulosa 4000 cP	0.38	3.34
Poliacrilamida 1%	0.58	1.49
Poliacrilamida 1.5%	0.68	4.99
Poliacrilamida 2%	0.72	10.67

Al observar las soluciones de poliacrilamida al 1% se observa que el índice de consistencia es el más bajo de todas las soluciones (1% con 1.5%: $p \leq 0.05$; 1% con 2%: $p \leq 0.001$). La solución de poliacrilamida al 1.5% presentó un valor de “ k ” más alto que la solución de 1% y menor que 2% (1.5% con 2% $p \leq 0.01$). En cambio, la solución de poliacrilamida preparada al 2% fue la que presentó el valor de “ k ” más alto, como era de esperarse ya que al incrementar la concentración del polímero, el fluido se hace más espeso.

Los valores observados de “ n ” son más grandes que los observados en las soluciones de metilcelulosa, por lo que la poliacrilamida aunque es pseudoplastica, es menos pseudoplastica que la metilcelulosa. Además se encontraron diferencias significativas con la solución de 1% y 1.5% ($p \leq 0.01$).

En este trabajo, nosotros utilizamos la solución de metilcelulosa de 400 cP para la estandarización y para hacer los experimentos con los espermatozoides nadando. Es importante mencionar que se ha observado que la viscosidad del mucus cervical al inicio del periodo ovulatorio es de ~ 200 cP (Smith *et al.*, 2009). Sin embargo, estos valores varían de manera significativa entre muestras y presentan una gran variabilidad, hasta de un orden de magnitud a la mitad del ciclo menstrual (periodo ovulatorio). Por lo tanto, estamos trabajando dentro del rango fisiológico. Además en trabajos anteriores con espermatozoide de humano se ha utilizado el mismo medio de metilcelulosa con viscosidades de 400 cP y aún mayores (Smith *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que se ha observado en espermatozoides de invertebrados marinos, como el abulón, *Haliotis rufescens*, que la adaptación a su ambiente físico-químico juega un rol importante para alcanzar el éxito en la fecundación (Riffell y Zimmer, 2007; Zimmer y Riffell, 2011).

2. Fotoactivación de P3 con espermatozoides pegados por la cabeza

2.1 Análisis de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoide de humano

En este objetivo se utilizaron espermatozoides de humano pegados con poli-L-lisina por la cabeza a las laminillas, de manera que los flagelos sí se pueden mover. Los espermatozoides totalmente pegados al cubre-objeto respondieron con un incremento pequeño en la fluorescencia, ésta fue otra razón por la que nos enfocamos en las células pegadas por la cabeza a pesar de que el análisis de estas imágenes requiere una labor intensa. Además, el poder observar la movilidad del flagelo nos hizo posible confirmar la viabilidad de las células. De las células viables, la mayoría respondieron con un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza después de la fotoactivación de P3 (52/59 células).

En la respuesta de los espermatozoides a la fotoactivación de P3, se analizó el incremento de la fluorescencia en la cabeza y observamos que el 86% de las células responde con incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$, como se puede observar en la **Figura 19**.

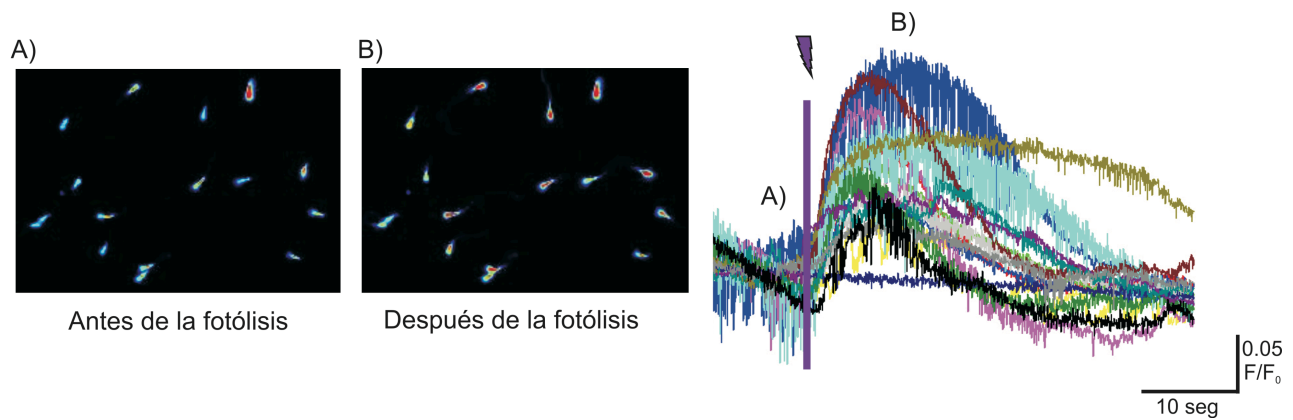


Figura 19. Incremento de la fluorescencia en espermatozoides de humano pegados por la cabeza y cargados con Fluo-3 en respuesta a la fotoactivación de P3 (en MEH, 2 mM de Ca^{2+}). En la figura se muestra una imagen de los espermatozoides antes de la fotoactivación de P3 (A) y 10 seg después de la fotoactivación de P3 (B). En el panel del lado derecho se muestran los trazos del cambio de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides antes y después de la fotoactivación (línea morada). Los espermatozoides presentan un incremento transitorio de Ca^{2+} como ya se ha reportado anteriormente (Meizel y Turner 1991; Harper, Kirkman-Brown *et al.* 2003; Harper, Barratt *et al.* 2004; Bedu-Addo, Barratt *et al.* 2007).

Para el análisis de esta sección, seleccionamos a los espermatozoides que cumplen los siguientes criterios: i) que la célula responda a la fotoactivación con un incremento en la fluorescencia de la cabeza, ii) que el flagelo permanezca en el campo focal, iii) que el flagelo del espermatozoide no se sobrelape con otro flagelo o cabeza durante el tiempo que duró el registro. Posteriormente, rastreamos las imágenes de fluorescencia de los espermatozoides que cumplieron con los criterios anteriores (8 células). El rastreo del flagelo se llevó a cabo con el programa Bohboh 3.42. El rastreo consistió en ir marcando/dibujando de manera manual la forma del flagelo en base a la imagen de fluorescencia del registro para cada una de las imágenes de cada película (~ 130 imágenes de cada célula). Posteriormente, el programa rastrea el flagelo en las imágenes subsecuentes, tomado en cuenta una serie de parámetros previamente determinados, como buscar los pixeles más brillantes y que estén cercanos entre una imagen y otra, la longitud del flagelo, etc. Después de que se llevó a cabo el rastreo semiautomático, se aseguró que el programa no se haya equivocado, si es el caso, la corrección se debe de hacer de manera manual.

Además, en esta sección también se determinó el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto en la cabeza, como en el flagelo debido a que no hay reportes de cómo se incrementa el Ca^{2+} en toda la célula y cómo es el comportamiento de este incremento en respuesta a la progesterona.

En la **Figura 20** se observa una célula cargada con el colorante sensible a Ca^{2+} , Fluo-3, la célula está pegada por la cabeza y el flagelo puede moverse libremente. Los primeros dos cuadros muestran al espermatozoide antes de la fotoactivación de P3. Los siguientes cuadros muestran la respuesta del espermatozoide después de la fotoactivación. Los insertos en los cuadros muestran el cambio de fluorescencia de la cabeza y las imágenes

grandes el cambio de fluorescencia en el flagelo. También se puede observar que el flagelo cambió de posición después de la fotoactivación.

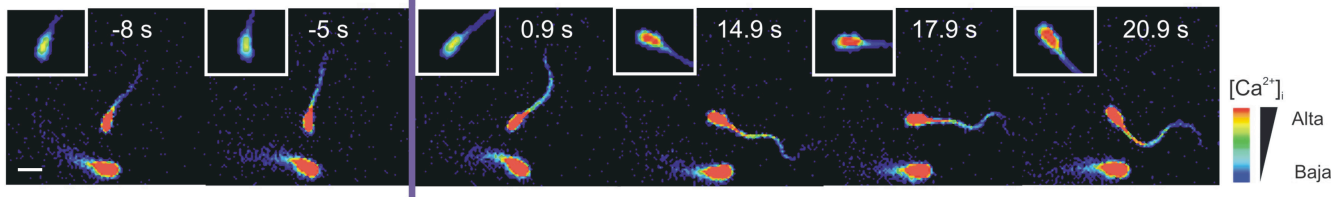


Figura 20. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y en el flagelo de espermatozoides de humano. Se muestra una secuencia de imágenes de una célula antes y después de la fotólisis ($t=0$, barra morada) de P3. Es posible observar el incremento en la intensidad de la fluorescencia en la cabeza y en el flagelo. Las imágenes representan al espermatozoide en distintos tiempos de la respuesta a P3. Los insertos de las figuras muestran la cabeza del espermatozoide con distinta escala de pseudocolor para observar el incremento de fluorescencia. Respecto al flagelo, además del incremento de fluorescencia respecto a la basal, se observó un cambio de posición. La intensidad de fluorescencia está en pseudocolor, como se indica en la barra de la derecha. La barra de escala equivale a $5 \mu\text{m}$.

Por otro lado, en las películas originales observamos que había una onda de Ca^{2+} que se propagaba desde la pieza media hacia la parte distal del flagelo (**Figura 20** y **Figura 21-A**). Por esta razón decidimos hacer una normalización en la fluorescencia del flagelo, tomando en cuenta la fluorescencia basal de cada punto en el flagelo (**Figura 21-B**). Es importante mencionar que el volumen citoplásmico del flagelo es menor comparado con el de la cabeza, además que éste se va reduciendo a medida que se aleja de la cabeza. Esta característica nos hace difícil observar el cambio de fluorescencia en las partes distales del flagelo. Al analizar las imágenes con la fluorescencia normalizada notamos que no existe una onda de Ca^{2+} de alguna región en particular. Al parecer, lo que ocurre es que la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa en toda la célula al mismo tiempo (**Figura 21-B**) y para comprobarlo de manera cuantitativa decidimos analizar los valores del $t_{1/2}$ de la respuesta en diferentes secciones del flagelo (**Figura 22**). Partiendo desde la unión cabeza-pieza media ($0 \mu\text{m}$) el flagelo se dividió en segmentos de $5 \mu\text{m}$ hasta alcanzar los $30\text{-}35 \mu\text{m}$ (dependiendo de la intensidad de la fluorescencia). Al comparar los $t_{1/2}$ de las secciones del flagelo notamos que no hubo diferencias significativas (por medio de una ANOVA) (**Figura 22**). Por lo anterior, logramos observar que no hay una onda en la propagación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona, es decir, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se da al mismo tiempo a lo largo todo el flagelo y en la cabeza.

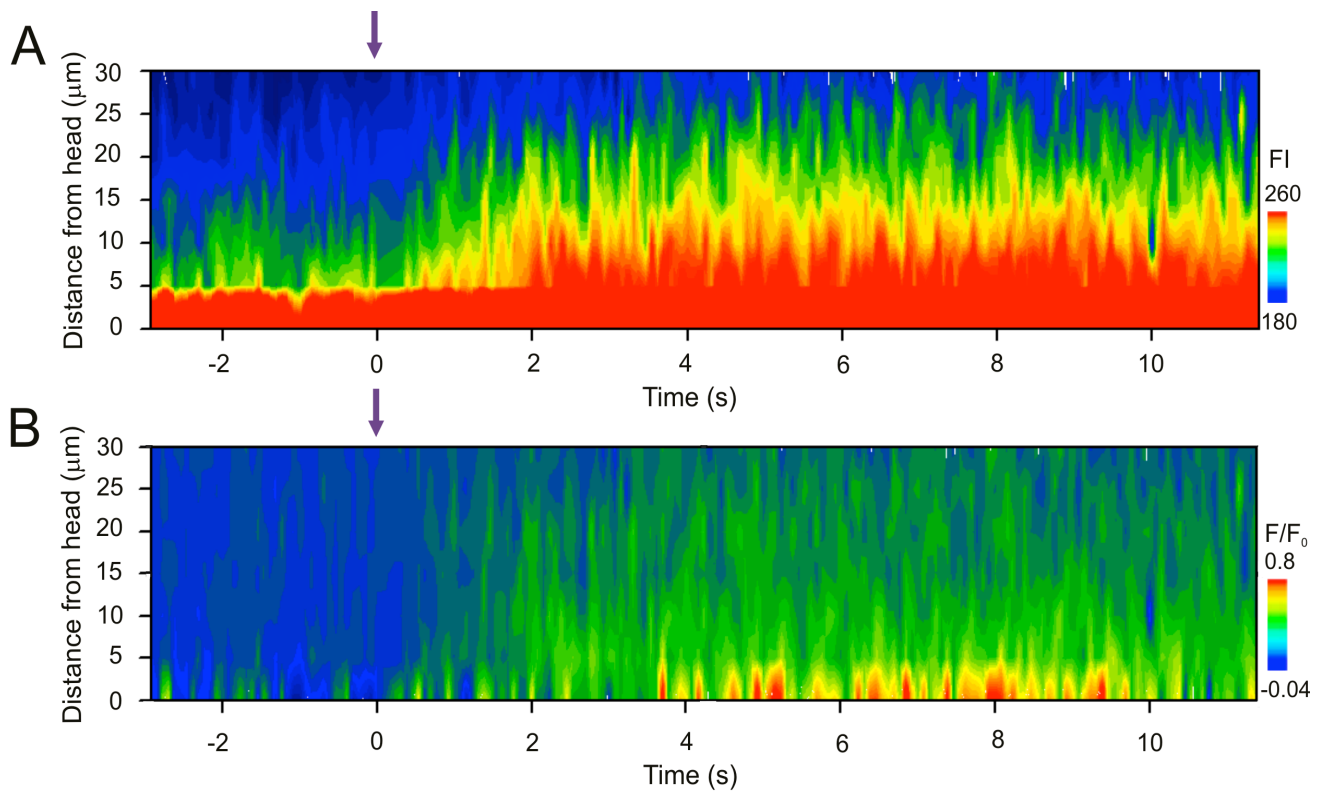


Figura 21. Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo del espermatozoide de humano de la Figura 18 en respuesta a la fotoactivación de P3. En **A** se muestra un diagrama de contornos que representa la fluorescencia del flagelo antes y después de la fotoactivación (200 mseg de luz UV, flecha morada), este esquema presenta los valores antes de la normalización del flagelo desde la unión cabeza-pieza media hasta la parte distal del flagelo (30 μm). En **B** está representado el mismo trazo que en **A** pero ya normalizado.

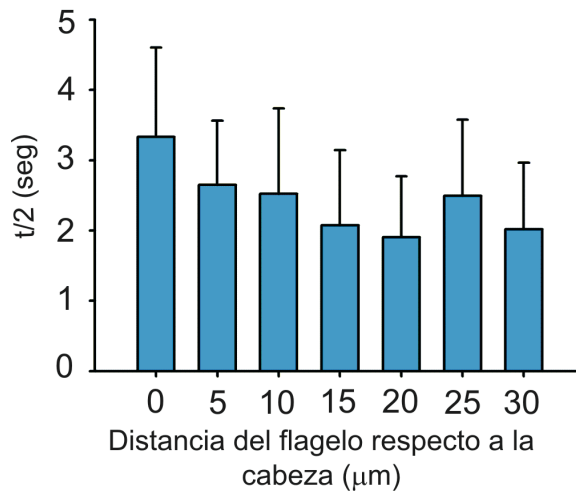


Figura 22. Variabilidad en el $t_{1/2}$ de la respuesta a P3 en los flagelos de espermatozoide de humano, divididos en segmentos de 5 μm . En la gráfica se muestra el $t_{1/2}$ promedio del flagelo de las diferentes células analizadas en secciones de 5 μm desde la unión cabeza-pieza media (0 μm) hasta 30 μm (n=8). Las barras de error indican desviación estándar

En la **Figura 23-A** se observa los trazos de la cinética del incremento en la fluorescencia del colorante Fluo-3 en la cabeza y en el flagelo de la célula de la **Figura 20** en respuesta a la fotólisis de P3. Es decir, la liberación de progesterona induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza y en todo el flagelo. Este incremento está

normalizado a su nivel máximo para facilitar la comparación de ambas cinéticas (**Figura 23-A**). Posteriormente se determinó el tiempo en el cual se alcanza el 50% de respuesta ($t_{1/2}$) tanto en la cabeza como en el flagelo para todas las células analizadas ($n=8$). El promedio de esta cuantificación se muestra en la **Figura 23-B**, el valor del $t_{1/2}$ para la cabeza es de 2.2 ± 1.05 seg y el de todo el flagelo es de 2.7 ± 0.55 seg, estos valores no tienen diferencias significativas, es decir, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se da al mismo tiempo en toda la célula. Sin embargo, es importante mencionar que hay gran variabilidad en los datos obtenidos respecto al flagelo (**Figura 23-C**), es decir, en algunas células la $[Ca^{2+}]_i$ incrementó primero en la cabeza y luego en el flagelo o viceversa, pero se puede observar que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza tiene menos variabilidad que los datos obtenidos del flagelo, esto se puede deber a que la señal de fluorescencia obtenida del flagelo es más pequeña porque tiene menor contenido citoplásmico y puede albergar menos colorante que la cabeza.

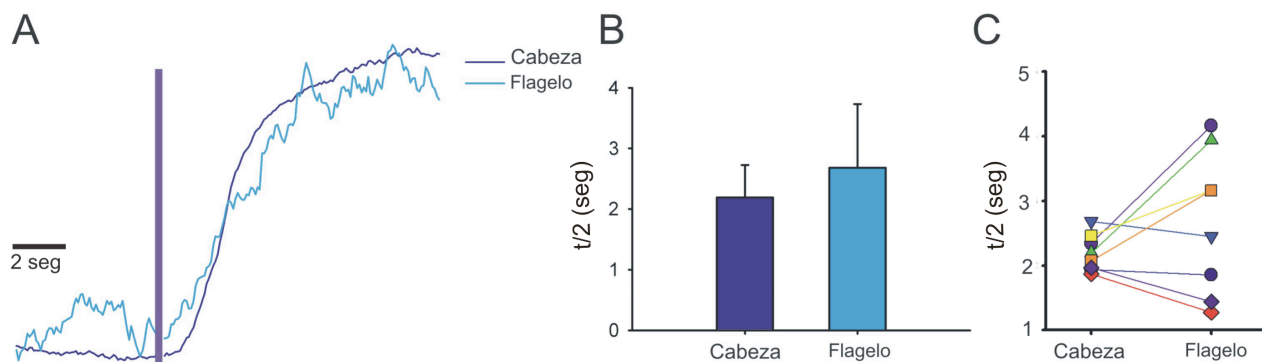


Figura 23. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en cabeza y flagelo de espermatozoides de humano. En **A** se muestra el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la fotólisis (barra morada) de P3 (200 mseg de luz UV) tanto en la cabeza (azul) como en el flagelo (azul claro) de la célula de la **Figura 20**, ambos trazos están normalizados para poder comparar las cinéticas. En **B** se muestra el $t_{1/2}$ promedio ($n=8$) de la cabeza (2.2 seg) y de todo el flagelo (2.7 seg) en respuesta a la fotólisis de P3. En **C** se observa el $t_{1/2}$ de la cabeza y del flagelo de cada célula analizada, ambos valores están unidos por una línea y cada color representa a una célula. Las barras de error indican desviación estándar.

La diferencia en el $t_{1/2}$ es de pocos segundos (~ 2 seg) y en otras células se han observado ondas de Ca^{2+} en un intervalo de tiempo más amplio, como en el caso de la onda de Ca^{2+} inducida por progesterona en espermatozoide de ratón. En la cual se observa de manera muy clara el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ desde la base de la cabeza hacia la zona acrosomal y comienza a disminuir entre los 90-210 seg (Fukami *et al.*, 2003).

Tomando en cuenta los resultados de esta sección y al compararlos con la onda de Ca^{2+} inducida por progesterona que ya se ha descrito en espermatozoide de ratón, podemos concluir que lo que pasa en espermatozoide de humano es muy diferente. Esto nos puede sugerir que el receptor de progesterona en ambas especies es diferente o tiene una sensibilidad muy diferente, ya que en ratón la RA se induce con 50-100 μ M de progesterona (Fukami *et al.*, 2003), en cambio en humano se necesita 3 μ M (Fukami *et al.*, 2003; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). Además nuestros resultados son importantes ya que apoyan las diferencias que se encontraron recientemente en la respuesta inducida a progesterona en espermatozoide de humano y de ratón.

En las cuales el canal CatSper del espermatozoide de ratón no responde a progesterona, en cambio en humano es capaz de incrementar la corriente del canal CatSper (I_{CatSper}) en respuesta al estímulo con progesterona (Lishko *et al.*, 2011). Estos mismos autores proponen que el canal CatSper es el receptor de progesterona en espermatozoide de humano (Lishko *et al.*, 2011; Strunker *et al.*, 2011). Sin embargo, como en ratón no observaron ningún efecto en la corriente de este canal al estimularlo con progesterona, atribuyen las diferencias a las subunidades accesorias del canal CatSper (CatSper- δ y CatSper- γ) (Lishko *et al.*, 2011; Strunker *et al.*, 2011). Ambas subunidades poseen un dominio extracelular muy grande (Chung *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007), el cual podría funcionar como receptor o como sitio de reconocimiento de progesterona. Además el nivel de identidad de las subunidades de humano y de ratón es bajo (CatSper- δ : 51%, CatSper- γ : 55% y CatSper- β : 56%) (Liu *et al.*, 2007), lo que puede justificar las diferencias de reconocimiento de los ligandos.

En muchos otros trabajos se ha estudiado el cambio de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por progesterona, pero éstos sólo se han limitado a los cambios que ocurren en la cabeza (Harper *et al.*, 2003; Kirkman-Brown *et al.*, 2003, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). Hasta la fecha no se había logrado detectar la fluorescencia del flagelo de espermatozoide de humano en movimiento, por lo que es importante resaltar que este trabajo es el primer reporte que logra detectar la fluorescencia del flagelo de espermatozoides de humano en movimiento, permitiendo un análisis más fino de los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ espacio-temporales.

3.2 Análisis de la curvatura de los flagelos de espermatozoides de humano antes y después de la fotólisis de P3

Después de analizar la cinética del incremento de Ca^{2+} , decidimos analizar el flagelo de los espermatozoides para conocer si hay algún cambio en la movilidad en respuesta a la progesterona. En esta sección se determinó la curvatura de los flagelos utilizando el programa Bohboh 3.42.

En la **Figura 24-A** se muestra el cambio de posición en el tiempo que presentó el espermatozoide de la **Figura 20**; esta célula cambió de posición después de la fotoactivación de P3, los colores indican el cambio de posición del flagelo en distintos tiempos (negro: -3 a 0 seg; azul: 0 a 3 seg; rojo: 3 a 6 seg; verde: 6 a 9 seg). También se muestra el cambio en la curvatura del flagelo del mismo espermatozoide antes (negro) y después de 3 seg de la fotoactivación (rojo) (**Figura 24-B**). En la **Figura 24-C** está representado el promedio del valor absoluto de la curvatura en distintos tiempos. Se utilizó esta forma de representación de la curvatura porque si se obtiene el promedio de la curvatura, como hay valores positivos y negativos, el promedio no reflejará el cambio de la curvatura, por lo que se vera sub-representado, en cambio si se toma el valor absoluto, es posible

conocer el cambio neto de la curvatura. En la **Figura 24-C** se puede observar que la curvatura del flagelo incrementa después de la fotoactivación, principalmente en la parte distal del flagelo. Probablemente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ induce el cambio en la curvatura y ésta a su vez puede inducir el cambio de posición en el flagelo.

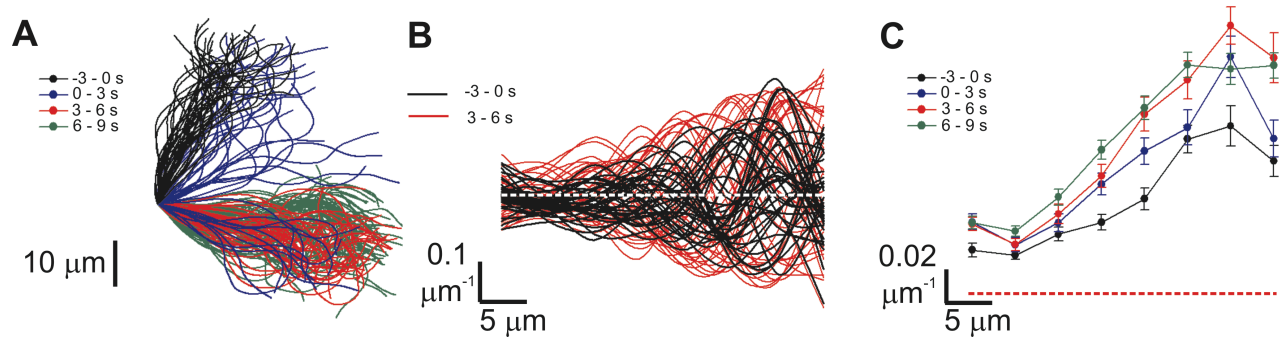


Figura 24. Efecto de la fotoactivación de P3. En **A** se muestra la posición del flagelo antes y después de la fotoactivación de P3 de la célula de la **Figura 20**; en negro se muestra la posición del flagelo antes de la fotoactivación, en azul 3 seg después, en rojo de 3 a 6 seg después de la fotoactivación y en verde 6-9 seg después de la fotoactivación. En **B** se muestra la curvatura antes (líneas negras) y 3-6 seg después de la fotoactivación (líneas rojas), la línea blanca punteada indica la curvatura con valor 0. En **C** se muestra el valor absoluto promedio de la curvatura en distintos puntos del flagelo, desde la unión cabeza-pieza media hasta 35 μm adelante. Las líneas de colores muestran el promedio del valor de la curvatura en diferentes tiempos.

De las 8 células analizadas, se obtuvieron distintas respuestas. En todas se observó el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ tanto de la cabeza como del flagelo en respuesta a la liberación de progesterona, aunque en distinta proporción. Sin embargo, no todas las células presentaron cambios en la curvatura o en la posición (**Figura 24**).

De las células que sí presentaron un cambio en la curvatura del flagelo se obtuvieron varios patrones en la respuesta, como el caso donde se observa un cambio ligero en la curvatura y no hay cambio de posición en el flagelo (**Figura 25-A**). En otros casos se observa un incremento en la curvatura sólo en la parte distal del flagelo, en particular parece haber un cambio de curvatura negativa hacia valores de curvatura positivos (un cambio de simetría). Junto con el cambio de curvatura, se observó un cambio de posición en el flagelo después de la fotoactivación, de hecho, el espermatozoide comienza a girar (**Figura 25-B**). En la **Figura 25-C** se observa un espermatozoide en el cual la curvatura en la parte distal del flagelo incrementa después de la fotoactivación, además hay un ligero cambio de posición en el flagelo después de la liberación de progesterona. Existen otros casos donde la curvatura del flagelo cambia en la parte media a valores menores de curvatura y no hay cambio de posición (probablemente porque se mantiene la simetría del flagelo) (**Figura 25-D**). Las otras 2 células no presentaron incremento en la curvatura después de la fotoactivación de P3 (datos no mostrados). Como se puede observar, la respuesta después de la fotólisis de P3 respecto a la curvatura y a la posición del flagelo es muy heterogénea; sin embargo, lo que sí es consistente es el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ después de la fotoactivación tanto en la cabeza como en el flagelo.

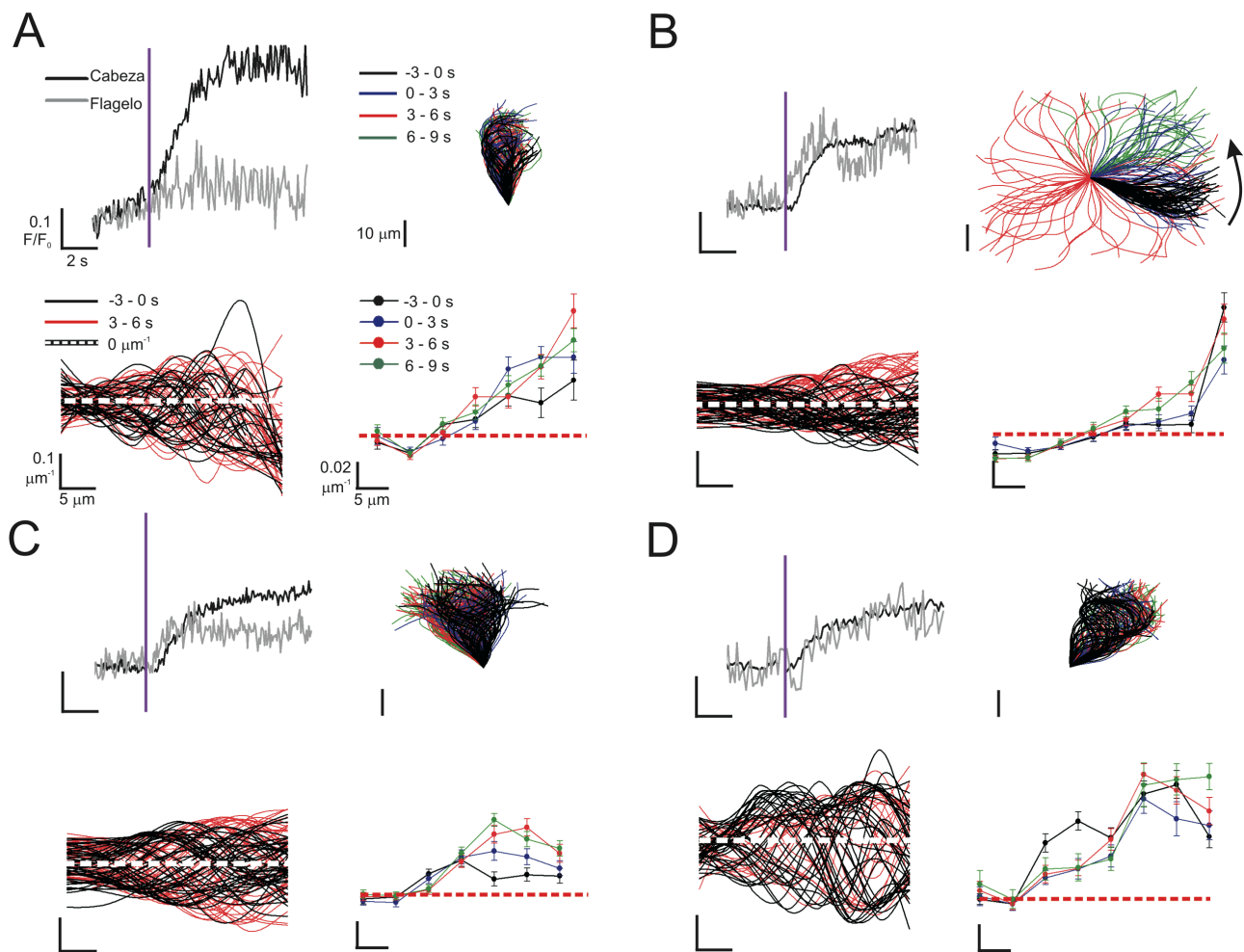


Figura 25. Diferentes respuestas de los espermatozoides de humano a la fotoactivación de P3. En **A**, se muestra el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la cabeza (línea negra) y en el flagelo (línea gris) de un espermatozoide que no tuvo cambio de posición (superior derecho), sin embargo, sí presentó un cambio en la curvatura (inferior izquierdo y derecho). En **B**, se muestra el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la cabeza (línea negra) y del flagelo (línea gris) de un espermatozoide que comenzó a girar después de la fotoactivación de P3 (superior derecho) y cambios en la curvatura en la parte distal del flagelo (inferior derecho e izquierdo). En **C** se muestra el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la cabeza (línea negra) y del flagelo (línea gris) de un espermatozoide que tuvo un ligero cambio de posición (superior derecho), así como de curvatura (inferior derecho e izquierdo). En **D**, están los trazos del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la fotólisis de P3 en la cabeza (línea negra) y en el flagelo (línea gris) de un espermatozoide, así como el ligero cambio de posición (superior derecho) y curvatura (inferior derecho e izquierdo). La línea morada en los trazos de Ca^{2+} (superior izquierdo) indica el momento de la fotoactivación (200 msec). En los trazos de posición (superior derecho) y curvatura (inferior derecho e izquierdo), la línea negra representa el comportamiento antes de la fotoactivación, la línea azul de 0 a 3 seg después del flash, en rojo de 3 a 6 seg y en verde de 6 a 9 seg después de la fotoactivación.

La diversidad en las respuestas puede ser debido a que los espermatozoides tengan distinto estado de capacitación. También puede ser por la variabilidad intrínseca del modelo, aunado a que en una población de espermatozoides hay algunos que están hiperactivados, otros solo activados y otros cambian de un estado de movilidad a otro de manera intermitente (Mortimer, 2000). Además, no hay que olvidar que el compuesto enjaulado que estamos utilizando tiene una actividad basal alta, por lo que esta variabilidad de respuestas también puede deberse a que los espermatozoides tengan una regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada antes de la

fotoactivación por efecto de la actividad basal de P3 (se discutirá mas adelante en la **Sección 4 de Resultados y discusión**). Todas estas posibilidades no son excluyentes, es decir, pueden estar ocurriendo varias o todas al mismo tiempo.

Como control, los espermatozoides fueron expuestos sólo al pulso de luz UV de 200 mseg sin el compuesto enjaulado (**Figura 26**), esto se realizó para observar si la irradiación de luz era capaz de inducir alguna respuesta por sí sola. Respecto a la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene similar antes y después de la irradiación de luz UV (**Figura 26**).

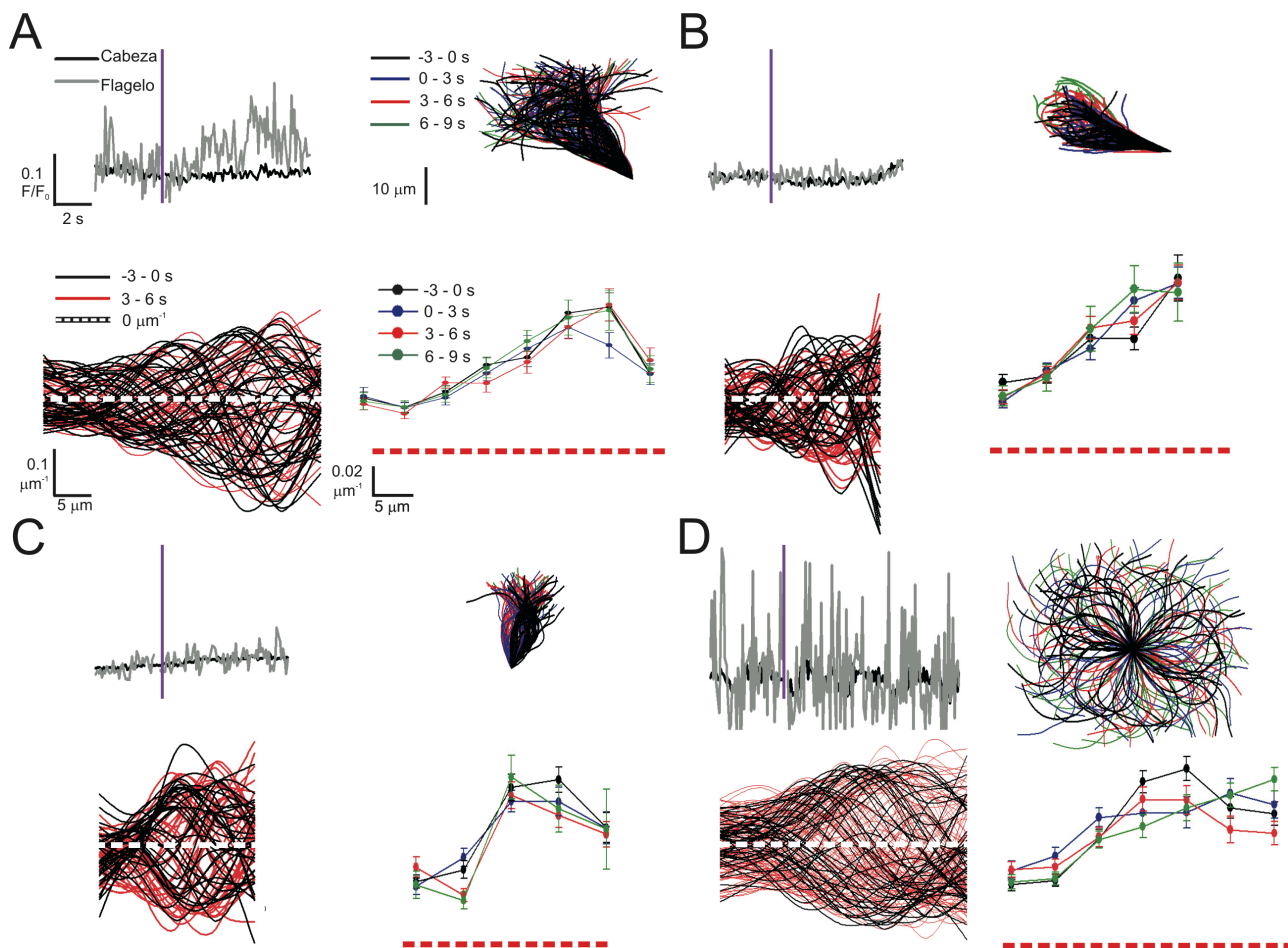


Figura 26. Respuestas de espermatozoides de humano a la irradiación de luz UV (200 mseg) sin P3. En **A**, se muestra el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de la cabeza (línea negra) y flagelo (línea gris) de un espermatozoide que no tuvo cambio de posición antes y después de la irradiación de luz UV (superior derecho), ni cambios en la curvatura del flagelo(inferior). En **B**, se muestra la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza (línea negra) y en el flagelo (línea gris) de un espermatozoide irradiado con luz UV sin P3, que no presentó cambios en su posición (superior derecho) ni en la curvatura (inferior derecho e izquierdo). En **C**, se muestra el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de la cabeza (línea negra) y del flagelo (línea gris) de un espermatozoide que no presentó cambios de posición (superior derecho) ni de curvatura (inferior derecho e izquierdo). En **D**, están los trazos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la fotólisis de P3 en la cabeza (línea negra) y en el flagelo (línea gris), así como la posición (superior derecho) y la curvatura (inferior derecho e izquierdo), donde no se presentaron cambios; este espermatozoide se estaba moviendo antes de la irradiación con Luz UV y continuó moviéndose después del pulso de luz UV, sin P3. La línea morada en los trazos de Ca^{2+} indica el momento de la fotoactivación (200 mseg). En los trazos de posición (superior derecho) y curvatura (superior derecho e izquierdo) la línea negra representa el comportamiento antes de la irradiación de luz UV (sin P3), la línea azul de 0 a 3 seg después del flash, en rojo de 3 a 6 seg y en verde de 6 a 9 seg después de la fotoactivación. Debido a la poca fluorescencia de los flagelos, en el caso **B** y **C** pudimos detectar sólo 20 μm en longitud.

Sin embargo, sí hubo una diferencia que llamó nuestra atención, la fluorescencia del flagelo de los espermatozoides control era menor que los expuestos a P3 (**Figura 27**). Lo anterior puede ser debido al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que se produce por la actividad basal de P3, ya que como se había mencionado anteriormente, la $[Ca^{2+}]_i$ no recupera hasta los niveles basales o previos a la fotoactivación. Esta característica hizo que rastreáramos una menor longitud del flagelo ($\sim 25 \mu\text{m}$) en comparación con los incubados con P3 ($\sim 35 \mu\text{m}$) como se puede observar en la **Figura 26**.

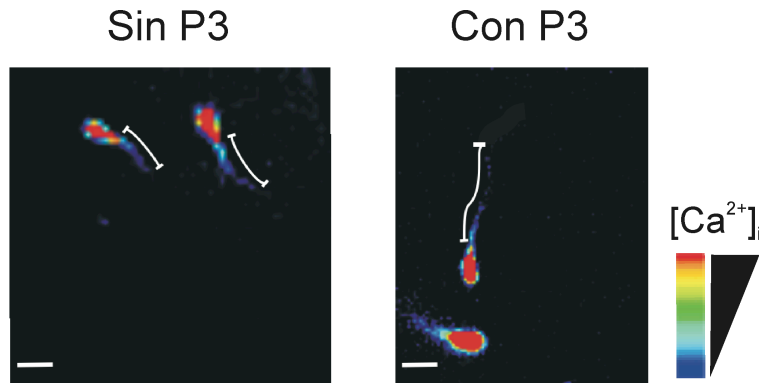


Figura 27. Diferencia en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides incubados sin P3 y con P3. En la figura se puede observar que las células control, que no fueron incubadas con P3, presentan menor intensidad de fluorescencia que las incubadas con P3 (por 5 min). Probablemente debido a que el compuesto P3 incrementa la $[Ca^{2+}]_i$, lo que induce que la fluorescencia incremente, a diferencia de los espermatozoides sin P3 que presentan una menor $[Ca^{2+}]_i$ al igual que una intensidad de fluorescencia menor. La barra de escala representa $5 \mu\text{m}$.

Los espermatozoides que fueron expuestos a las condiciones control no presentaron cambios en la curvatura después de la irradiación de luz UV, por lo que la luz UV no causa ningún efecto. Sin embargo, la diversidad observada en los espermatozoides estimulados con progesterona puede deberse al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que causada por la actividad basal de P3. Este efecto también puede ser inducido por la liberación de la progesterona después de la fotoactivación, es decir, sería una respuesta a la entrada de Ca^{2+} extracelular. No obstante, el cambio significativo que observamos en la curvatura de algunas células y tomando en cuenta que ahora se conoce al canal CatSper como el receptor de progesterona en espermatozoide de humano y su función en ratón, es posible relacionar esta información con los resultados que se obtuvieron en este trabajo. El canal CatSper regula la movilidad hiperactivada en ratón, es decir, induce el cambios la curvatura del flagelo que se ven reflejados en una marcada asimetría en el batido flagelar (ver **Figura 6, B**). En este trabajo se observaron cambios significativos en la curvatura del flagelo de algunos espermatozoides de humano estimulados con la fotoactivación de P3, por lo que podemos sugerir que al igual que en ratón, el canal CatSper regula la movilidad en los espermatozoides de humano al incrementar la curvatura del flagelo. Este incremento en la curvatura, principalmente en la parte distal le puede ayudar al espermatozoide a nadar de manera progresiva en fluidos viscoso.

4. Efecto de la progesterona sobre espermatozoides móviles en soluciones de alta viscosidad

4.1 Prueba de condiciones de fotoactivación de P3 en soluciones de alta viscosidad

En esta sección se registraron imágenes de fluorescencia de los espermatozoides que nadan en los medios de alta viscosidad. Se aplicó un estímulo de progesterona al fotoactivar P3 para inducir el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y algún cambio en la movilidad de los espermatozoides.

En la primera condición, se utilizó una solución de metilcelulosa con una viscosidad de 400 cP disuelta en MEH (2 mM de Ca^{2+}). Los espermatozoides fueron estimulados con un pulso de luz UV de 200 mseg para fotoactivar P3 (320 nM), por lo que utilizamos la misma condición previamente establecida para estimular a las células pegadas en la solución de registro MEH (de viscosidad similar al agua). La velocidad de nado de los espermatozoides disminuyó de manera significativa en los medios viscosos (**Apéndice 1**), lo cual nos ayudó a registrar las imágenes de fluorescencia de células individuales por un periodo más prolongado, a diferencia del MEH normal (de viscosidad similar al agua, ~ 1 cP). Sin embargo, a simple vista, no se observó una respuesta en particular (**Figura 28**). Lo mismo ocurrió con la solución de metilcelulosa a 1500 cP (datos no mostrados).

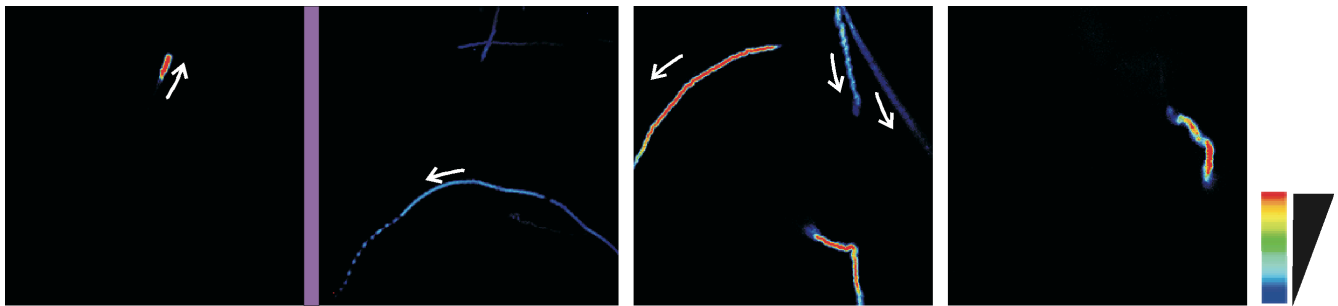


Figura 28. Imágenes de espermatozoides nadando libremente en una solución de 400 cP con fotoactivación de P3 (concentración final: 320 nM) en todo el campo. La primer imagen muestra la intensidad de fluorescencia integrada de 3 seg de un espermatozoide cargado con Fluo-3 antes del pulso de luz UV (200 mseg, línea color morado) en todo el campo visual. Las imágenes subsecuentes corresponden a la fluorescencia integrada de 30 seg después de la fotoactivación de P3 (1.5 min). Las flechas muestran la dirección de los espermatozoides. La fluorescencia esta representada en una escala de pseudocolor, donde el color azul representa la intensidad mas baja de fluorescencia y el color rojo representa la mayor intensidad de fluorescencia.

Para incrementar la concentración de progesterona liberada al fotoactivar P3, extendimos la duración de la irradiación del pulso de luz UV a 1 seg (**Figura 29**) y posteriormente extendimos la duración durante todo el registro (**Figura 30**). Al observar ambas condiciones no detectamos ninguna respuesta como la que ya habíamos observado anteriormente con las células pegadas al cubreobjetos.

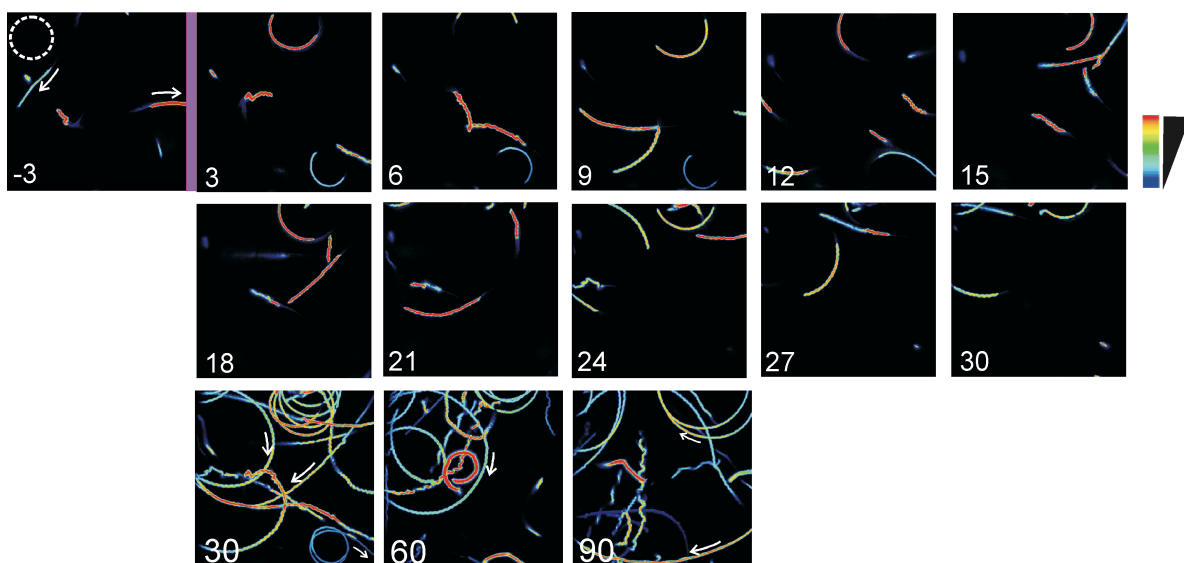


Figura 29. Imágenes de espermatozoides nadando en una solución que presenta una viscosidad de 400 cP con iluminación puntual de 1 seg para fotoactivar P3. La primera imagen muestra la intensidad de fluorescencia integrada de 3 seg de espermatozoides cargado con Fluo-3 antes del pulso de luz UV (1 seg) en la esquina superior izquierda del campo (círculo blanco punteado) se muestra el sitio de fotoactivación. Las imágenes subsecuentes corresponden a la fluorescencia integrada de 3 seg después de la fotoactivación de P3. Las últimas tres imágenes muestran la intensidad de fluorescencia integrada de 30 seg. Las flechas muestran la dirección de los espermatozoides y los números el tiempo en segundos.

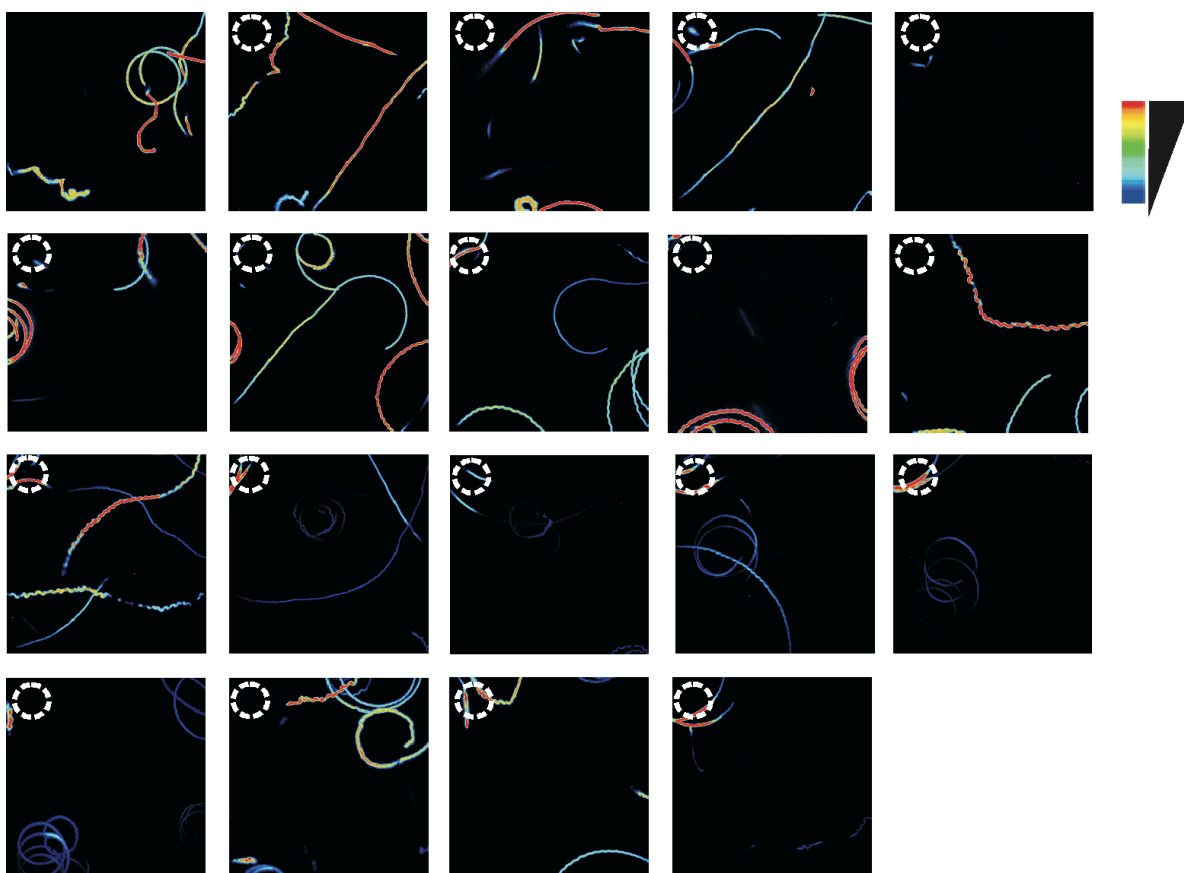


Figura 30. Imágenes de espermatozoides nadando libremente en una solución con una viscosidad de 400 cP con iluminación puntual continua para fotoactivar P3. Todas las imágenes muestran la intensidad de fluorescencia integrada de 30 seg de espermatozoides cargado con Fluo-3 antes del pulso de luz UV (continuo) para fotoactivar P3, que se encuentra en la esquina superior izquierda del campo (círculo gris).

En los siguientes experimentos redujimos el área de irradiación de luz UV para evitar algún daño a las células. La irradiación de luz UV se efectuó con una fibra óptica delgada (0.1 mm) en una esquina del campo visual; en respuesta a la fotoactivación continua de P3, esperábamos que se formara un gradiente de progesterona. En estos experimentos primero irradiamos con luz UV durante 1 seg y posteriormente la irradiación duró todo el registro. En ambos casos no se observó ninguna respuesta en particular a la fotoactivación de P3, respecto a cambios en la movilidad o en la fluorescencia.

En esta serie de experimentos no logramos observar cambios drásticos en la movilidad ni en la fluorescencia de manera clara. Además, el incremento en la fluorescencia después de la fotoactivación de P3 no es tan claro en los espermatozoides nadando en metilcelulosa, como lo habíamos observado anteriormente con las células pegadas. Por lo tanto, decidimos analizar de manera más cuidadosa la fluorescencia de las células para así determinar si hubo o no respuesta a la fotoactivación.

4.2 Análisis cuantitativo de la respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides de humano nadando en una solución de alta viscosidad

En los experimentos anteriores, con las células pegadas, se observó un incremento significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el estímulo de la fotoactivación, aunque las respuestas de la movilidad del flagelo no fueron significativas en algunas células (**Sección 3.2 de Resultados**). Sin embargo, con las células nadando en la solución de metilcelulosa 400 cP, no se observó ninguna respuesta típica respecto al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, así como tampoco se registraron cambios en la movilidad. Confirmamos que las soluciones con alta viscosidad (metilcelulosa y poliacrilamida) no absorbieron luz UV (datos no mostrados), porque si fuera el caso no se llevaría a cabo la reacción de fotólisis, además estas soluciones no impiden la respuesta celular cuando se hacen los experimentos de fotoactivación de P3 con células pegadas (**Figura 31**). Una posible explicación de la poca respuesta respecto al bajo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la fotólisis (con los espermatozoides nadando en metilcelulosa), puede deberse a los cambios en la intensidad de fluorescencia provocados por cambios en la posición de las células y en el plano focal de éstas. Ya que las células se cargaron con Fluo-3, un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} que incrementa su intensidad cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta. Sin embargo, es difícil distinguir un cambio en la intensidad de fluorescencia por el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ o por cambios en el plano focal de las células.

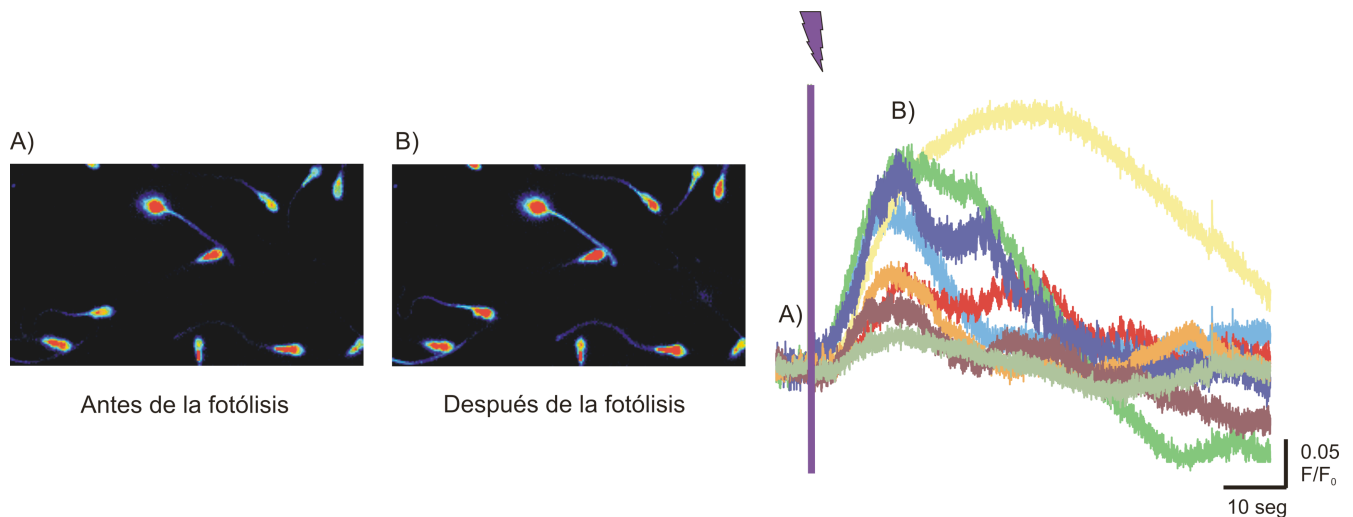


Figura 31. Incremento de la fluorescencia en respuesta a la fotoactivación de P3 en espermatozoides de humano pegados por la cabeza en un medio de metilcelulosa. En la figura se muestra una imagen de los espermatozoides antes de la fotoactivación de P3 (A) y 10 seg después de la fotoactivación de P3 (B). En el panel del lado derecho se muestran los trazos del cambio de la intensidad de fluorescencia, que representan el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, de los espermatozoides en respuesta a la fotoactivación (línea morada). Se puede observar que los espermatozoides pegados son capaces de responder a la fotoactivación cuando están inmersos en un medio de metilcelulosa.

Para evaluar los efectos netos de la respuesta a la fotoactivación de P3 sobre los espermatozoides nadando, es importante analizar cuantitativamente el nivel de la $[Ca^{2+}]_i$ y el patrón de movilidad del espermatozoides antes y después del estímulo. Por lo anterior, se hizo una selección de espermatozoides, la cual nos permitió realizar el análisis cuantitativo de las respuestas celulares. Los espermatozoides analizados debían tener las siguientes características:

- Permanecer en el campo visual antes (~ 2 seg) y después (por lo menos 10 seg) del flash de luz UV.
- Permanecer en el plano focal durante el registro.

En particular, la mayoría de las células no se quedaron por tiempo suficiente (es decir, antes y después de la fotoactivación) en el plano focal para evaluar el efecto del estímulo. A diferencia de los espermatozoides de invertebrados marinos, los espermatozoides de mamífero no presentan tigmotaxis, es decir, el contacto con una superficie como el portaobjeto hace que los espermatozoides nadan en círculo. Por lo anterior, es difícil la observación por tiempos prolongados de los espermatozoides de humano. Además, en el sistema de captura de imágenes fluorescentes utilizamos un objetivo de apertura numérica grande (1.4 en nuestro sistema) por lo que el plano focal es muy delgado y es fácil que los espermatozoides se salgan de foco. Por todas estas razones, las células que podemos analizar son pocas (20% de la población total) y en su mayoría son las que nadan en círculo. Otras células que nadan de manera progresiva pueden estar en foco en el campo visual pero estas

células se salen del campo demasiado rápido y no es posible capturarlas por el tiempo suficiente para su evaluación.

Después de haber probado muchas condiciones para la fotoactivación de P3, decidimos analizar las respuestas celulares en una de las condiciones. La condición elegida fue igual a la de los experimentos con células pegadas (**Sección 3.2 de Resultados**), excepto que esta vez se utilizó la solución de metilcelulosa con viscosidad de 400 cP, en lugar del MEH (medio acuoso). La duración de la irradiación de luz UV: 200 msec; irradiación de luz UV en todo el campo visual, utilizando una fibra óptica gruesa (2 mm) durante 1.5 min en la solución de metilcelulosa de 400 cP; 320 nM de P3;

Es importante mencionar que las células que nadan en un medio experimental con una viscosidad similar al agua nadan ~ a 90 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (**Apéndice 1**), lo que hace muy difícil seguir a las células con una resolución temporal suficiente. Sin embargo, al incrementar la viscosidad (solución de metilcelulosa 400 cP) del medio experimental logramos disminuir la velocidad de nado de los espermatozoides en promedio a ~ 30 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Por lo tanto, el uso de medios viscosos nos permite observar más fácilmente el nado de los espermatozoides antes y después de la fotoactivación de P3.

Después de elegir una condición se analizaron los siguientes parámetros: i) la velocidad curvilínea de los espermatozoides y ii) el cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (la intensidad de fluorescencia).

4.2.1 Velocidad curvilínea de espermatozoides de humano nadando en un medio de metilcelulosa 400 cP

Para evaluar el efecto de la fotoactivación de P3 sobre la movilidad del espermatozoide, se determinó la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides nadando en la solución de metilcelulosa 400 cP. La VCL se define como la distancia total de desplazamiento de la cabeza entre el tiempo que dure el registro. Para obtener este valor, se rastreó la posición de la cabeza de los espermatozoides semiautomáticamente en cada imagen usando el programa Bohboh 3.42. Posteriormente, se determinó la velocidad curvilínea como se describió en la sección de métodos.

Al analizar la VCL de los espermatozoides antes y después de la fotoactivación con P3, se obtuvieron tres tipos de respuesta: los espermatozoides que incrementaban su VCL después de la fotoactivación de P3 (6/21), los que la disminuyeron (4/21) y los que no presentaron cambios (11/21). Estos resultados se muestran en la **Tabla 3**. Como se puede observar, los tipos de respuesta son muy variables. En promedio las células nadaron a

26.77 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (± 4.87) antes de la fotoactivación y a 26.23 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (± 4.67) después de la fotoactivación, en el promedio obtenido no hay diferencia significativa.

Tabla 3. Cambio de VCL de los espermatozoides al fotoactivar P3 ($p \leq 0.5$)

Células que incrementaron su velocidad después de la fotoactivación	6/21
Células que disminuyeron su velocidad después de la fotoactivación	4/21
Células que no cambiaron su velocidad después de la fotoactivación	11/21

La VCL de las células en el medio control también presentó variabilidad, aunque la “n” es más pequeña (6 células). Sin embargo, los resultados de VCL obtenidos de los espermatozoides en esta condición confirman que hay heterogeneidad en la forma de nado. En esta condición, la mitad de las células disminuyeron su VCL después del pulso de luz UV, dos células la incrementaron y una permaneció constante. El promedio de VCL de las células antes de la fotoactivación es de 20.68 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (± 7.11) y 18.23 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (± 5.57) después de la fotoactivación. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cambio de VCL de los espermatozoides al ser estimulados con un pulso de luz UV (200 msec) en ausencia de P3 ($p \leq 0.5$)

Células que incrementaron su velocidad después de la fotoactivación	2/6
Células que disminuyeron su velocidad después de la fotoactivación	3/6
Células que no cambiaron su velocidad después de la fotoactivación	1/6

Los parámetros estudiados en este tipo de análisis presentan una gran variabilidad. Las células estimuladas por la fotoactivación de P3 presentaron respuestas muy diferentes en la VCL: incremento, disminución o ningún cambio, sin observarse una tendencia en particular. También, en las células control, la VCL después del pulso de luz UV fue variable, aunque el número de células analizadas es pequeño. Considerando que la variedad es muy grande, es difícil encontrar un comportamiento particular en respuesta al estímulo con progesterona.

4.2.2 Cambio de fluorescencia en los espermatozoides nadando en un medio de metilcelulosa 400 cP

Por otro lado, al analizar el cambio en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides, también observamos distintos patrones en la respuesta. Había células que aparentemente incrementaron la intensidad de fluorescencia después de la fotoactivación de P3 (**Figura 32**), pero no de una manera similar a lo que ya habíamos observado con las células pegadas (**Figura 19**). En otras células no incrementó la intensidad de fluorescencia después de la fotoactivación (**Figura 33 y 34**) y en el resto de las células no pudimos determinar si el cambio de fluorescencia era real o un artefacto causado por un gradiente de luz, por lo que las denominamos “indeterminadas”. El resumen de resultados se muestra en la **Tabla 5**.

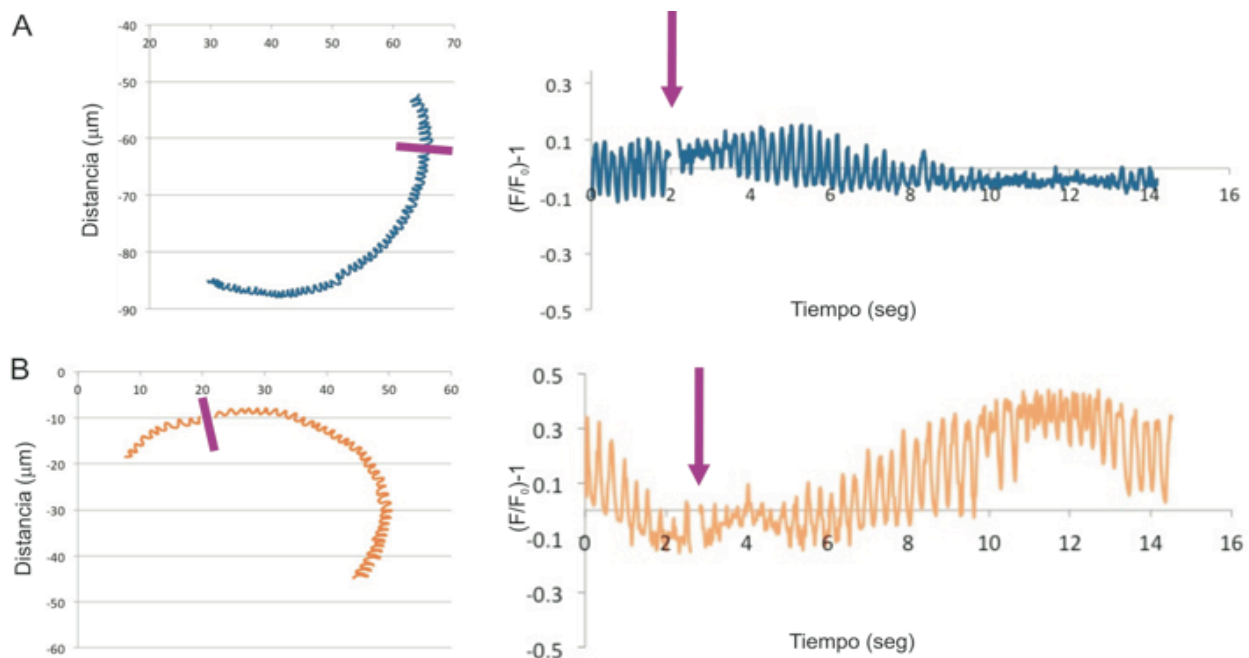


Figura 32. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados en respuesta a la fotoactivación P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP). En la figura se muestra la trayectoria de los espermatozoides nadando (paneles izquierdos) antes y después de la fotoactivación de P3 (rectángulo morado). Del lado derecho de muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia en el tiempo antes y después de la fotoactivación. Estas dos células incrementan la intensidad de fluorescencia después de fotoactivar P3. La célula **A** presenta una VCL de antes de la fotoactivación de $16.37 \mu\text{m}/\text{seg}$ y de $14.01 \mu\text{m}/\text{seg}$ después de la fotoactivación. La célula **B** presenta una VCL de $11.36 \mu\text{m}/\text{seg}$ antes de la fotoactivación y de $8.82 \mu\text{m}/\text{seg}$ después de la fotoactivación.

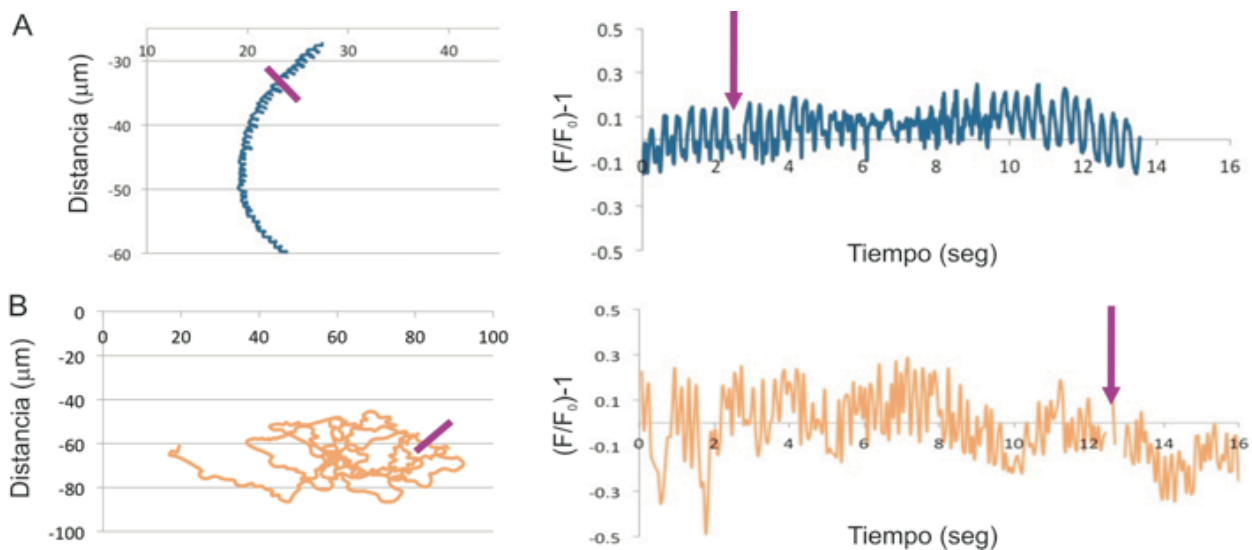


Figura 33. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados al fotoactivar P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP). En la figura se muestra la trayectoria de los espermatozoides nadando (lado izquierdos) antes y después de la fotoactivación de P3 (rectángulo morado). Del lado derecho de muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia antes y después de la fotoactivación. Estas dos células no presentan incremento (como el observado en células pegadas) en la intensidad de fluorescencia después de fotoactivar P3. La célula **A** presenta una VCL de 7.16 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes de la fotoactivación y de 7.51 $\mu\text{m}/\text{seg}$ después. La célula **B** presenta una VCL de 25.37 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes de la fotoactivación y de 29.05 $\mu\text{m}/\text{seg}$ después de la fotoactivación.

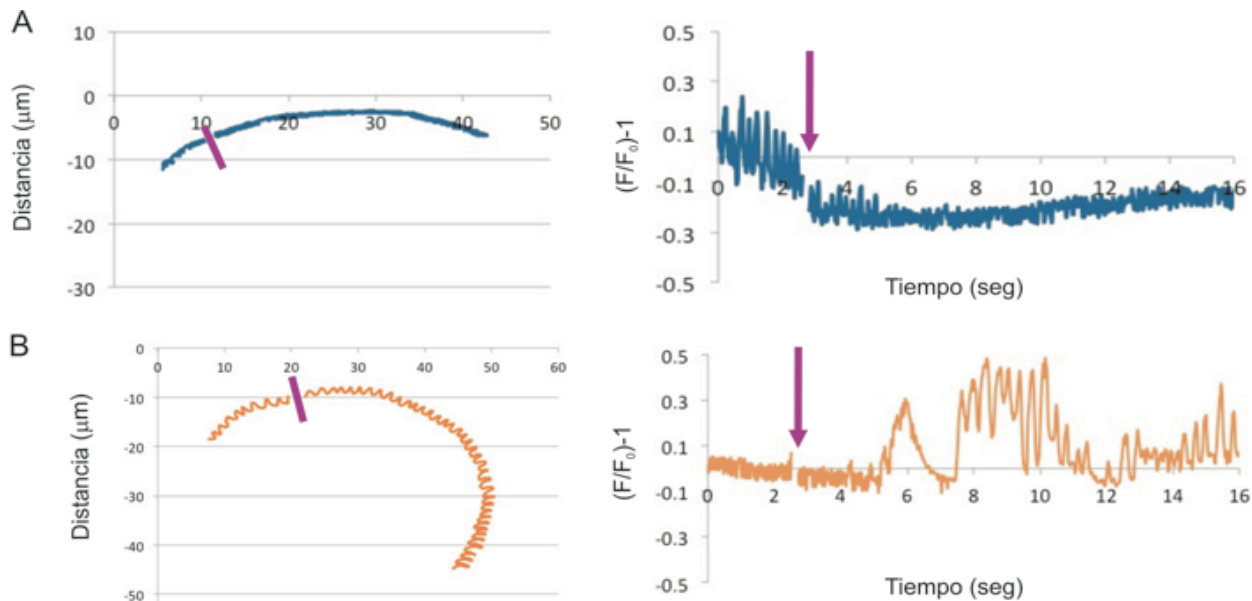


Figura 34. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados al fotoactivación P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP). En la figura se muestra la trayectoria de los espermatozoides nadando (lado izquierdos) antes y después de la fotoactivación de P3 (rectángulo morado). Del lado derecho se muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia antes y después de la fotoactivación. Estas dos células no presentan incremento (como el observado en células pegadas) en la intensidad de fluorescencia después de fotoactivar P3. Antes de la fotoactivación, la célula **A** parece que disminuir su fluorescencia y después de la fotoactivación ya no disminuye más, en cambio se mantiene, esto puede ser una respuesta, pero no es la que ya habíamos observado anteriormente (**Figura 18**). La célula **B** no tiene un incremento de fluorescencia inmediatamente después de la fotoactivación, en cambio, hay un incremento en la fluorescencia pero 1.5 seg después de la fotoactivación, lo cual es diferente a lo que ya habíamos observado anteriormente. La célula **A** presenta una VCL de 7.06 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes de la fotoactivación y de 9.24 $\mu\text{m}/\text{seg}$ después. La célula **B** presenta una VCL de 3.51 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes de la fotoactivación y de 4.52 $\mu\text{m}/\text{seg}$ después de la fotoactivación.

Tabla 5. Cambio de intensidad de fluorescencia de los espermatozoides al fotoactivar P3

Células que incrementaron su fluorescencia después de la fotoactivación	6/21
Células que no incrementaron su fluorescencia después de la fotoactivación	10/21
Células indeterminadas	5/21

Respecto a las células que no presentaron incremento de fluorescencia después de la fotoactivación (10/21). Lo que se observó fue una variedad en la respuesta; hubo 3 células que mantuvieron la misma intensidad de fluorescencia después de la fotoactivación (**Figura 33**) y otras que sólo no incrementaron la fluorescencia después de la fotoactivación, pero sí presentaron otros cambios en intensidad en otro tiempo (7 células) (**Figura 34**). Un ejemplo se observa en la **Figura 34-A**, antes del flash la fluorescencia iba disminuyendo y después del flash la pendiente de disminución cambió. Esta dinámica de fluorescencia no la consideramos como incremento “clásico”, ya que estamos tomando la cinética de las células pegadas como referencia (**Figura 19**). En la **Figura 34-B**, no hay un incremento inmediato a la fotoactivación de P3, pero sí hubo un incremento de fluorescencia 1.5 seg después de la fotoactivación, así como una recuperación muy rápida al nivel basal, respuesta que no concuerda con las respuestas observadas en las células pegadas (**Figura 19**).

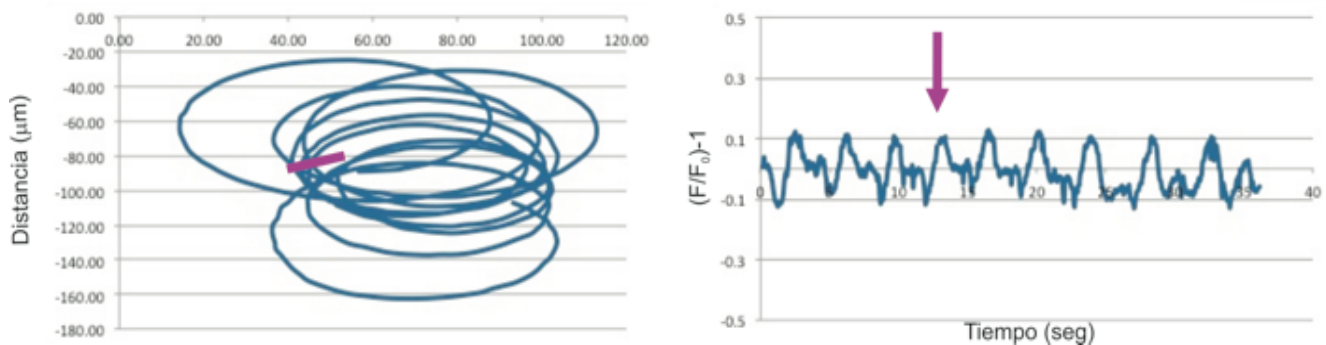


Figura 35. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados al fotoactivación P3 en un medio de metilcelulosa (400 cP). En la figura se muestra la trayectoria de un espermatozoide nadando (lado izquierdo) antes y después de la fotoactivación de P3 (rectángulo morado). Del lado derecho se muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia antes y después de la fotoactivación. Esta célula presenta oscilaciones en la intensidad de fluorescencia antes y después de fotoactivar P3; VCL antes de la fotoactivación 48.82 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y de 50.90 $\mu\text{m}/\text{seg}$ después.

Respecto a los espermatozoides “Indeterminados”, no pudimos saber si el cambio de intensidad de fluorescencia reflejaba la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o había algún artefacto. Un gradiente (heterogeneidad) en la luz

de excitación y cambios en el plano focal podrían provocar cambios en la intensidad de fluorescencia de manera independiente al cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Las células “indeterminadas” presentaron oscilaciones en la intensidad de fluorescencia porque se acercaban y se alejaban del gradiente de luz (**Figura 35 y Tabla 5**). En la parte donde la luz era más intensa, la fluorescencia aumentaba, y donde la luz era menos intensa, la fluorescencia disminuía, por esta razón no pudimos determinar cómo respondían estas células o si había alguna respuesta.

Por otro lado, el cambio de fluorescencia de las células en el medio control (metilcelulosa sin P3) también fue variable. Se observaron células en las cuales la intensidad de fluorescencia disminuyó después del pulso de luz UV (2/6) (**Figura 36-C**), en una célula incrementó mucho la fluorescencia (**Figura 36-A**) y en otras no hubo cambio en la intensidad de fluorescencia por la estimulación con luz UV (3/6) (**Figura 36-B**). En estos experimentos no se observaron células con oscilaciones en la fluorescencia, por lo que no hubo registros “indeterminados”. El resumen de estos resultados se muestra en la **Tabla 6**. Como en los experimentos anteriores, en éstos también existe una gran heterogeneidad, lo cual indica que no se puede concluir si hay algún efecto de la irradiación de luz UV sobre los espermatozoides a pesar de la ausencia del análogo fotoactivable de progesterona (P3). Por lo tanto, no se puede concluir si hubo una respuesta de los espermatozoides al ser fotoactivados con P3.

Tabla 6. Cambio de intensidad de fluorescencia de los espermatozoides al ser estimulados con un pulso de luz UV (200 mseg) en ausencia de P3

Células con incremento de fluorescencia después del pulso de luz UV	1/6
Células con disminución de fluorescencia después del pulso de luz UV	2/6
Células sin cambios en la fluorescencia después del pulso de luz UV	3/6
Células indeterminadas	0/6

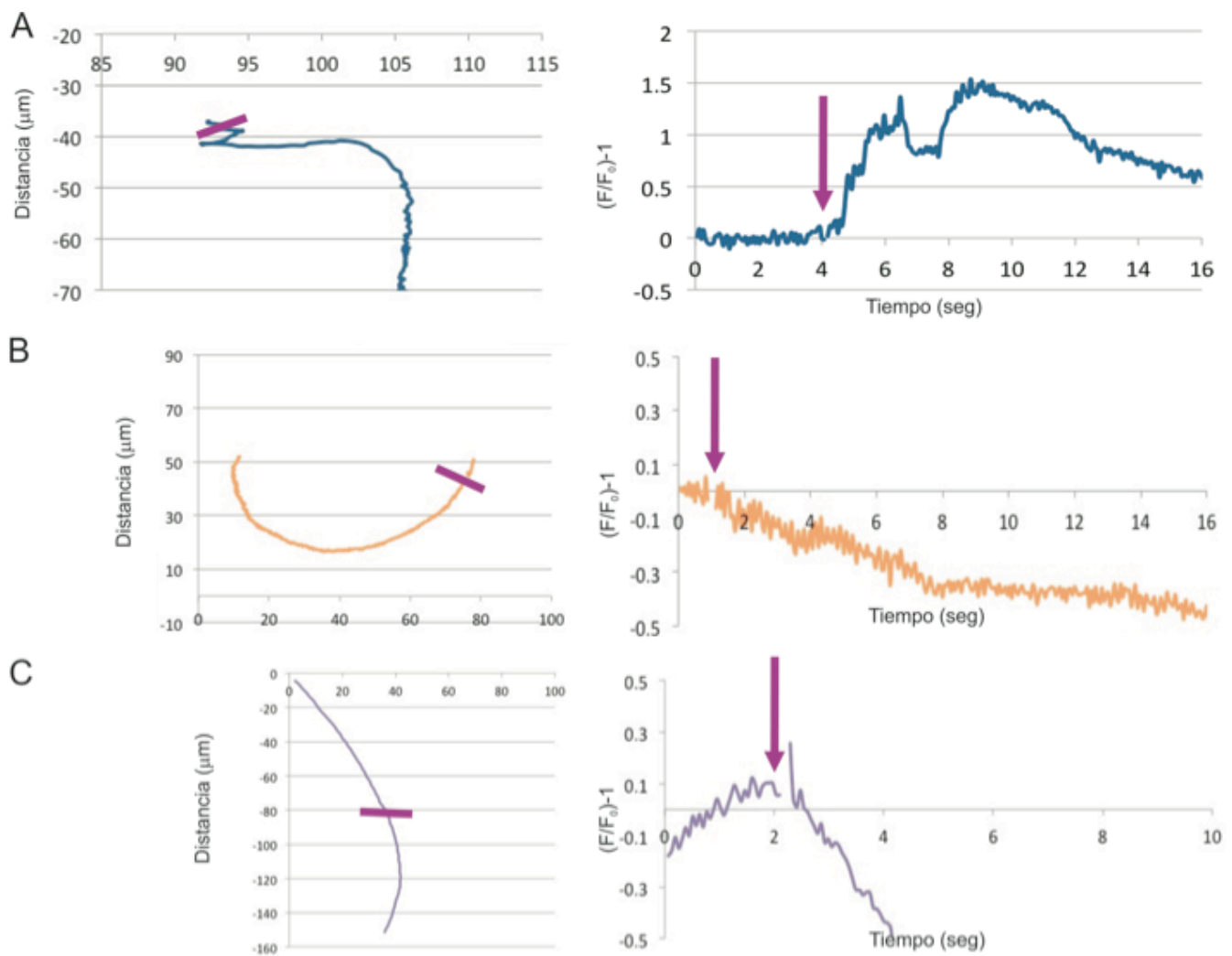


Figura 36. Cambio de la intensidad de fluorescencia y trayectoria de espermatozoides de humano capacitados en respuesta al estímulo de luz UV en un medio de metilcelulosa (400 cP). En la figura se muestra la trayectoria de los espermatozoides nadando (lado izquierdo) antes y después de la fotoactivación de P3 (rectángulo morado). Del lado derecho se muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia antes y después de la fotoactivación. En la célula **A** la intensidad de fluorescencia incrementa después de la fotoactivación, su velocidad es de 1.53 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y 4.79 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes y después del estímulo respectivamente. La células **B** mantiene la disminución de fluorescencia, la velocidad: 10.50 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y 8.47 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes y después del estímulo respectivamente. En la célula **C** la intensidad de fluorescencia baja después del pulso de luz UV, la velocidad: 38.64 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y 36.00 $\mu\text{m}/\text{seg}$ antes y después del estímulo respectivamente.

Respecto al cambio en la intensidad de fluorescencia, los resultados de la fotoactivación en las células nadando son muy diferentes a lo que ya habíamos observado en células pegadas, donde aproximadamente el 90% de las células presentaban un incremento transitorio después de la fotoactivación. Lo que observamos fueron respuestas con mucha variabilidad entre sí y que no se parecen a lo que ya habíamos observado en células pegadas. Además, no podemos descartar la posibilidad de que los cambios de fluorescencia que observamos estén sujetos a varios artefactos. Uno de ellos, sería el gradiente de luz de excitación y otro sería el cambio en el plano focal de las células debido al movimiento de éstas. Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que existe alguna diferencia entre las células pegadas y las células nadando. Además,

observamos que la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células totalmente pegadas (cabeza y flagelo) fue más pequeña que la de las células pegadas únicamente por la cabeza. No sabemos cual es la razón de estos resultados, pero es una diferencia notoria y reproducible.

Es cierto que sí observamos cambios en la intensidad de fluorescencia, pero no podemos determinar si éstos reflejan el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ o son cambios en el plano focal. Los cambios en el plano focal pueden ser debido a que los espermatozoides cuando nadan se mueven y en ocasiones salen del plano focal y luego vuelven a entrar de manera intermitente. Estos cambios en el plano focal se ven reflejados en el cambio en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides, lo que podemos confundir con cambios en la $[Ca^{2+}]_i$.

En esta sección, desafortunadamente, no observamos el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ni el cambio de movilidad en el nado progresivo de los espermatozoides estimulados por progesterona con la fotoactivación de P3. La razón principal de estos resultados se debe a la variedad de las respuestas. Además hay que recordar que las células analizadas pertenecen a una subpoblación (20 % de la población total), que en su mayoría nadaban en círculo. El resto de la población (80%) nadan de manera diferente y dentro de esta población existen algunas células que nadan de manera progresiva y otras que nadan cambiando de trayectoria y de plano focal. Esto quiere decir que el modelo utilizado, el espermatozoide de humano, presenta una gran variabilidad de formas de nado por sí mismo, lo cual se observó en los experimentos con metilcelulosa, así como en presencia y ausencia de P3 y en el análisis con el sistema CASA (ver **Apéndice 2**). El reporte más reciente de la WHO sobre la calidad de semen humano indica que solamente 4% de población de espermatozoides de humano posee una morfología normal (Cooper *et al.*, 2010), lo cual sugiere que existe una enorme variedad en la calidad de los espermatozoides en las muestras de semen humano. Considerando el reporte de WHO, la variabilidad es una característica propia que acompaña a los espermatozoides de humano.

A pesar de las desventajas del modelo, logramos disminuir la velocidad curvilínea de los espermatozoides con el uso de medios viscosos y la ventaja experimental es grande porque los espermatozoides que nadan en un medio de registro con una viscosidad similar al agua, lo hacen muy rápido y permanecen muy poco tiempo en el campo visual, lo que hace mas difícil rastrearlos. Los medios viscosos al disminuir la velocidad de los espermatozoides, nos permiten seguirlos y estudiarlos por mas tiempo.

5. Actividad basal de P3 en células individuales

En todos los resultados anteriores hemos observado variabilidad en las respuestas en mayor o menor grado mientras que las células en los experimentos control (sin P3) no presentan tanta variedad. A pesar de que existe una gran heterogeneidad de la calidad de las células en las muestras de espermatozoide de humano, la progesterona se ha utilizado como un ligando potente que induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en población (Blackmore, 1993; Blackmore *et al.*, 1990) como en células individuales (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). Una posible razón es que la actividad basal de P3, que corresponde a 1/8 de la actividad de progesterona (**Figura 14**). Por esta causa decidimos realizar una re-evaluación de la actividad de P3 (antes de la fotoactivación) de los espermatozoides de humano en microscopía y así conocer la utilidad de este compuesto. El protocolo que se llevó a cabo es el siguiente: los espermatozoides, previamente cargados con Fluo-3 se pegaron a una laminilla previamente tratada con poli-L-lisina, de manera que sólo se pegara la cabeza y el flagelo se moviera libremente en el MEH. Posteriormente, se registró la fluorescencia basal durante 1 min, se agregó P3 con pipeta (concentración final: 320 nM) y se registró la fluorescencia durante 5 min (el tiempo de incubación que se ha utilizado en todos los protocolos anteriores), posteriormente se llevó a cabo la fotoactivación con un pulso de luz UV de 500 mseg. Después de 1 min se agregó ionomicina (concentración final: 10 μ M) para obtener el máximo de fluorescencia y normalizar respecto a este valor cada uno de los incrementos de cada célula.

La adición de P3 (con pipeta) indujo distintos patrones en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$. Encontramos células con incrementos transitorios de Ca^{2+} (64.7%), como se observa en el trazo rojo y morado de la **Figura 37**; células que comenzaron a oscilar después de la adición del compuesto (26.5%) (**Figura 37**) y otros casos donde el Ca^{2+} comenzó a incrementar gradualmente durante los 5 min (35.3%) (**Figura 38**). Después de la fotoactivación de P3 (500 mseg), el 86% de las células respondieron con un incremento transitorio de la fluorescencia de Fluo-3 (**Figura 19**), lo que indica que si hay liberación de progesterona por la fotoactivación y que son capaces de responder a pesar de su actividad basal. El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 7**.

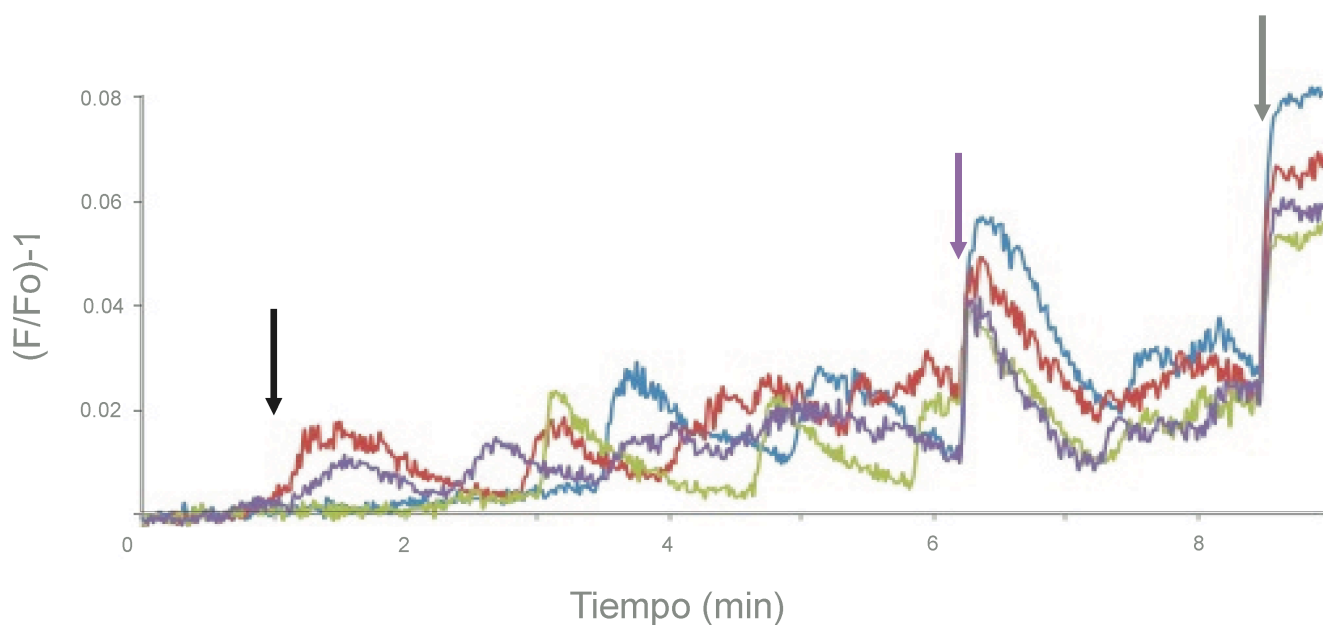


Figura 37. Células oscilando en respuesta a P3. En la figura se muestran los trazos de las respuestas de 4 células que presentaron oscilaciones después de la adición de P3 (1 min, flecha de color negro) con pipeta. Posteriormente se observó un incremento transitorio en dos células (líneas roja y morada) y en otras dos (líneas azul y verde) no hubo respuesta transitoria y todas las células presentaron oscilaciones después de la adición de P3. Después del minuto 6 se llevó a cabo la fotoactivación (flecha de color morado) y las 4 células respondieron. El último incremento se dio por la adición de ionomicina (8.5 min, flecha de color gris).

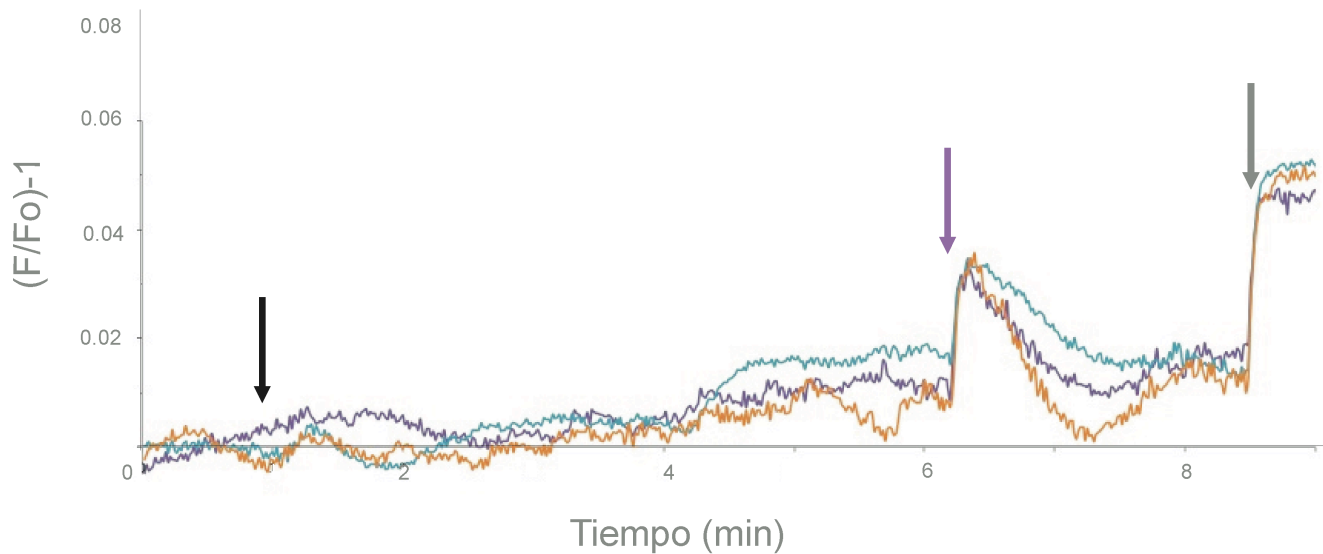


Figura 38. Células con incremento gradual de Ca^{2+} después de la adición de P3. En la figura se muestran los trazos de las respuestas de las células que presentaron aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la adición de P3 (1 min, flecha de color negro) con la pipeta. Posteriormente la $[Ca^{2+}]_i$ comenzó a incrementar poco a poco y no se observó una recuperación en la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Después de 6 min se llevó a cabo la fotoactivación (flecha de color morado) y las 4 células respondieron. El último incremento se dio por la adición de ionomicina (8.5 min, flecha de color gris).

Tabla 7. Resumen de resultados de la actividad basal de P3 en células individuales

Células que respondieron a la fotoactivación de P3	86%
Células con incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ transitorios	64.7%
Células con incremento gradual en la $[Ca^{2+}]_i$	35.3%
Células con oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$	26.5%

Al analizar de manera cuantitativa los valores de fluorescencia, se registró un incremento promedio de 36.7% (respecto a ionomicina) en la fluorescencia al agregar P3. El promedio de la fluorescencia de todas las células que respondieron a P3 10 seg antes de la fotoactivación fue de 12.1%. El máximo de amplitud alcanzado al fotoactivar P3 fue de 38.6%, pero este valor tiene incluido el incremento de la fluorescencia después de añadir P3, entonces al sustraer ese valor (12.1%), la amplitud promedio que se obtuvo al fotoactivar P3 fue de 26.5%, que es menor al incremento por P3 sin fotoactivar. En la **Tabla 8** está el resumen de estos resultados.

Tabla 8. Resumen de resultados de los patrones en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ con P3 en células individuales

Incremento máximo inducido por P3	36.7%
Promedio de amplitud de P3 10 seg antes de la fotoactivación	12.1%
Incremento máximo inducido por P3 después de la fotoactivación	38.6%
Incremento máximo inducido por P3 - Promedio de amplitud de P3	26.5%

Los controles se realizaron con progesterona (3 μ M). El incremento máximo inducido por progesterona fue de 83.69% respecto a ionomicina (100%). En estos experimentos se observaron células que comenzaron a oscilar después del incremento transitorio (11.4%), como ya se había reportado después de la adición de 3 μ M (Harper *et al.*, 2004).

Con estos experimentos pudimos observar que hay una parte de la población celular (26.5%) que comienza a oscilar después de añadir el análogo P3 (antes de la fotoactivación), también se observó otra porción de la población donde la $[Ca^{2+}]_i$ incrementó respecto al nivel basal en 35.3% de las células aunque no

haya oscilación. Por lo anterior, más de 50% de las células ya se encuentran en un estado de regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ diferente al basal.

Las células que muestran las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ pueden estar en un pico, valle o en una zona intermedia de la oscilación al momento de la fotoactivación. Dependiendo de la parte de la oscilación en la que se encuentren, la respuesta sería distinta. Si están en un pico de la oscilación, es decir, con la $[Ca^{2+}]_i$ alta, será difícil que respondan a la fotoactivación, y si responden, sería una respuesta pequeña. Si están en el valle de la oscilación, pueden presentar una respuesta grande y eso podrá verse reflejado en un cambio de movilidad. De hecho, durante la fase de la oscilación de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual se genera por la liberación de Ca^{2+} de pozas internas, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ está correlacionado positivamente al incremento de la amplitud del batido flagelar (Harper *et al.*, 2004). Ya que las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ no están sincronizadas en la población celular, el pulso de fotoactivación puede caer en cualquier punto de la oscilación en cada célula. Si la mitad de las células ya presentan Ca^{2+} elevado o con oscilaciones, eso hace que los experimentos tengan gran variabilidad desde un inicio. Lo anterior podría explicar porqué tanta variabilidad en la respuesta de los experimentos donde fotoactivamos P3. Considerando la alteración de la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la fotoactivación y la estrecha relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y la forma del flagelo en general, P3 no es un buen compuesto fotoactivable para contestar la pregunta que nos planteamos en un inicio, es decir, la regulación de la movilidad.

Por otro lado, aunque P3 posee una actividad basal alta, los resultados del estudio con las células pegadas sí son confiables porque estamos observando el cambio de fluorescencia en espermatozoides que no cambian de plano focal. Además, los resultados que observamos son compatibles con los resultados de Lishko, que observa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo (Lishko *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el 2009 se publicó un artículo en el cual reportan el desarrollo de una progesterona fotoactivable (Kilic *et al.*, 2009). Este compuesto posee la modificación con el grupo fotosensible en el C20, al igual que la nuestra (P3). La diferencia radica en que el otro compuesto tiene una cumarina como grupo fotosensible, en cambio, el que nosotros desarrollamos, P3, posee un grupo nitrobenzil (**Figura 39**). La ventaja de la progesterona fotoactivable con cumarina es que posee una actividad basal muy baja ya que con una adición de 5 μ M se produce un incremento del 2.5% respecto a 3 μ M progesterona, lo que corresponde a una concentración de 15 nM de progesterona. Lo anterior equivale a una actividad basal aproximadamente de 1/500 en comparación con la progesterona. La baja actividad basal permite que después de la fotoactivación ocurra una diferencia en la concentración de progesterona grande, (5 veces mayor que el incremento sólo con el compuesto fotoactivable) lo que permite que la respuesta del Ca^{2+} intracelular incremente.

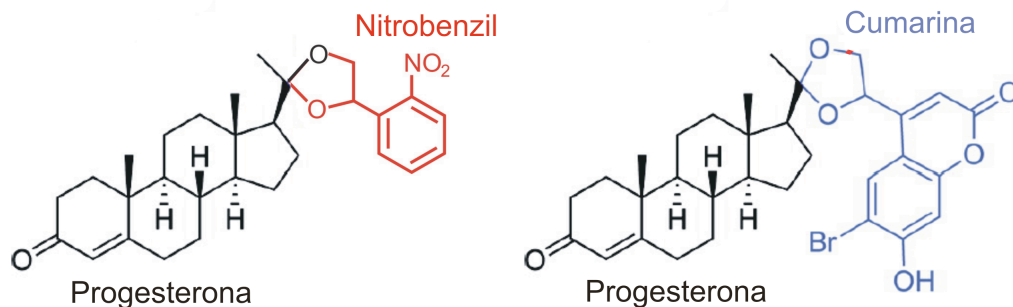


Figura 39. Estructuras químicas de las progesteronas fotosensibles. Del lado izquierdo se muestra la progesterona, P3, acoplada al grupo fotosensible nitrobenzil (en rojo), desarrollada para este trabajo. En el lado derecho, se muestra la progesterona acoplada con la cumarina (azul) como grupo fotosensible desarrollada por Kilic *et al*, 2009.

La cumarina es un grupo fotosensible mas grande que el grupo nitrobenzil (**Figura 39**), por lo que el impedimento estérico que ejerce la cumarina sobre el receptor de progesterona es mayor que el causado por el grupo nitrobenzil. Lo anterior puede explicar que la actividad basal de la progesterona con cumarina sea mucho menor. Además, la reacción de fotólisis que presenta la cumarina es mas eficiente, el rendimiento cuántico (que es una medida de cuantas moléculas que son excitadas son desensajuladas) es de: ~ 0.4 (Schmidt *et al.*, 2007) mientras que el rendimiento del grupo nitrobenzil es de ~ 0.15 (Ellis-Davies., 2007), por lo anterior, con la misma intensidad de luz UV teóricamente se deben desprender mas fácilmente los grupos que estén unidos a la cumarina que al grupo nitrobenzil, eso quiere decir que se liberaría mas progesterona con cumarina. Sin embargo, la reacción de fotólisis también depende de su ambiente fisicoquímico y de las moléculas que estén cercanos al grupo fotosensible. Por lo que la eficiencia cuántica de la progesterona unida a la cumarina o al nitrobenzil pueden ser diferentes a los valores mencionados anteriormente. De hecho, el coeficiente cuántico de la progesterona con cumarina es de 0.004 (Kilic *et al.*, 2009), lo que explicaría que con 5 μM de la progesterona con cumarina solo se libere 15 nM que equivale a 0.3% del compuesto. A diferencia de P3, donde se estimó que con 320 nM del compuesto, se liberaba 20 nM de progesterona, que equivale a 6% de fotólisis del compuesto (Servín-Vences, 2009). Al parecer, estas estimaciones nos sugieren que la eficiencia cuántica es mayor en P3 que en la progesterona con cumarina. Sin embargo, debido a la alta actividad basal de P3, resulta un compuesto fotoactivable no adecuado para el estudio de la movilidad de los espermatozoides de humano.

VI. Conclusiones

1. Características de las soluciones viscosas.

1.1. Todos los medios viscosos (3 de metilcelulosa y 3 de poliacrilamida) presentaron un valor de “ η ” menor a 1. Con respecto al índice “ k ” hubo mayor variabilidad.

1.2. No se observaron diferencias significativas entre los valores de “ η ” y “ k ” en las 3 soluciones de metilcelulosa y las 3 de poliacrilamida. Sin embargo, sí observamos diferencias significativas respecto a la VCL de los espermatozoides nadando en las diferentes soluciones viscosas, lo que quiere decir que habrá otros parámetros más sensibles para poder definir las diferencias entre las soluciones utilizadas.

2. Efecto del estímulo de progesterona por fotoactivación de P3 con espermatozoides pegados por la cabeza en el MEH (viscosidad similar al agua).

2.1. Observamos un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide, este incremento no parecía comportarse como onda de Ca^{2+} , sino como un incremento homogéneo en la cabeza y en el flagelo. Lo cual es diferente al incremento en respuesta a progesterona observado en espermatozoide de ratón y coincide parcialmente con los reportes recientes sobre el canal CatSper.

2.2. Observamos un incremento en la curvatura del flagelo, particularmente en la parte distal en la mayoría de los espermatozoides.

3. Efecto del estímulo de la progesterona por fotoactivación de P3 en células nadando en la solución de metilcelulosa 400 cP.

3.1. Observamos una gran variedad en las respuestas tanto de velocidad como en incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano.

3.2. El cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ no concordó con el resultado de las células pegadas. De hecho, con los experimentos realizados no podemos concluir si el cambio de fluorescencia se debe al cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ o a otros factores.

4. Re-evaluación de la utilidad del análogo fotoactivable P3.

4.1. P3 (320 nM) indujo un incremento transitorio (65%) en la $[Ca^{2+}]_i$, uno gradual (35%) en los espermatozoides pegados y una parte de la población presentaron oscilaciones (26%) en la $[Ca^{2+}]_i$.

4.2. Se observaron incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ sólo con la incubación de P3 (320 nM) por 5 min, lo cual sugiere una alteración en la movilidad antes de realizar la fotoactivación. Por lo tanto, P3 posee una actividad basal grande y no es un compuesto ideal para estudiar el efecto de la progesterona sobre la movilidad debido a la gran variabilidad generada en la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo.

VII. Perspectivas

Utilizar la progesterona que tiene cumarina como grupo fotosensible. Sin embargo, debido a que el espermatozoide de humano es muy sensible y heterogéneo, sería necesario medir la actividad basal en células individuales del compuesto fotosensible. Esta recomendación es importante ya que en los experimentos realizados en población no es posible observar las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, y en los estudios de movilidad esta respuesta puede alterar el comportamiento del flagelo haciendo que las interpretaciones de las respuestas sean más difíciles.

Para estudiar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ sería necesario un sistema para conocer la concentración del ion, como el uso de un colorante sensible a Ca^{2+} de cociente, es decir que pueda ser cuantificable y con el que se puedan eliminar los problemas o dudas con respecto al cambio en el plano focal de las células.

Se ha planteado que la hiperactivación depende de la $[Ca^{2+}]_i$ (Ho and Suarez, 2001, 2003; Suarez, 1996, 2008a), por lo que para estudiar la movilidad se podría utilizar directamente Ca^{2+} fotosensible y así poder conocer la dependencia de Ca^{2+} en la movilidad o algún otro segundo mensajero que induzca un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

Un tipo de experimentos que nos podrían dar una idea de cómo se comporta el flagelo en alta viscosidad sería pegando a las células por la cabeza y rastreando al flagelo, esta condición haría mucho más fácil el rastreo y no se necesitaría una resolución temporal tan alta (200 ips) para tener representado todo el ciclo del batido flagelar. En este tipo de experimentos se podría fotoactivar Ca^{2+} , alguna progesterona enjaulada o algún agonista que induzca incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.

Para estudiar la movilidad también se podrían hacer experimentos con la progesterona sin modificaciones disuelta en algún medio viscoso y añadiéndola desde un capilar en un medio (también viscoso) donde estén nadando los espermatozoides o dejándola salir por medio de difusión. De esta manera se crearía un gradiente de progesterona que induciría oscilaciones y esto a su vez una modulación en la movilidad.

Como ya se mencionó anteriormente, cuando realizamos los experimentos con los espermatozoides nadando en metilcelulosa el mayor problema fue el cambio de foco de las células. Por lo anterior, se podrían

observar a los espermatozoides nadando con un objetivo acoplado a un piezoeléctrico que se mueve en el eje Z para no perder estos datos.

Finalmente, hay grupos que han utilizado pinzas ópticas para medir la fuerza de nado en los espermatozoides. Con esta herramienta es posible atrapar a los espermatozoides y medir la fuerza que necesitan para escapar de las pinzas. Esta información sería útil para observar si existen subpoblaciones que se relacionen con los espermatozoides capacitados, o para conocer si existe algún efecto de los agonistas sobre la fuerza de nado de los espermatozoides, o para saber si hay diferencia entre la fuerza de los espermatozoides hiperactivados y no hiperactivados. Estos experimentos también se podrían realizar en medios viscosos, lo cual nos daría información importante sobre los cambios o adaptaciones que presentan los espermatozoides en estos medios.

VIII. Apéndice

1. Velocidad curvilínea de los espermatozoides de humano nadando en soluciones de alta viscosidad medida por microscopía

Hasta el momento solo hay un reporte de espermatozoides de humano nadando en soluciones de alta viscosidad (Smith *et al.*, 2009), en el cual determinaron varios parámetros del nado de los espermatozoides como la velocidad curvilínea, velocidad de propagación de la onda flagelar, longitud de onda, frecuencia del batido flagelar y curvatura. Sin embargo, en este trabajo, las células fueron pre-seleccionadas por su capacidad de migración (~ 2 cm) en un medio viscoso, por lo tanto, los datos no representan la variedad que posee una población completa.

Por lo anterior, utilizamos todas las células que hemos recuperado por el método de “swim-up” en nuestro análisis para obtener información sobre la distribución de la muestras. En esta sección sólo se determinó la velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de humano capacitados en soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida a 37 °C (**Figura 1**). Las soluciones que se probaron de metilcelulosa, fueron de 400 cP, 1500 cP y 4000 cP, estas son las viscosidades reportadas por la compañía a 20 °C y disueltas en agua, sin embargo, éste valor puede variar debido a la composición del medio (MEH, que es rico en sales) y a la temperatura. Las soluciones que se probaron de poliacrilamida fueron preparadas al 1%, 1.5% y 2% (no hay valores de viscosidad reportados por la compañía).

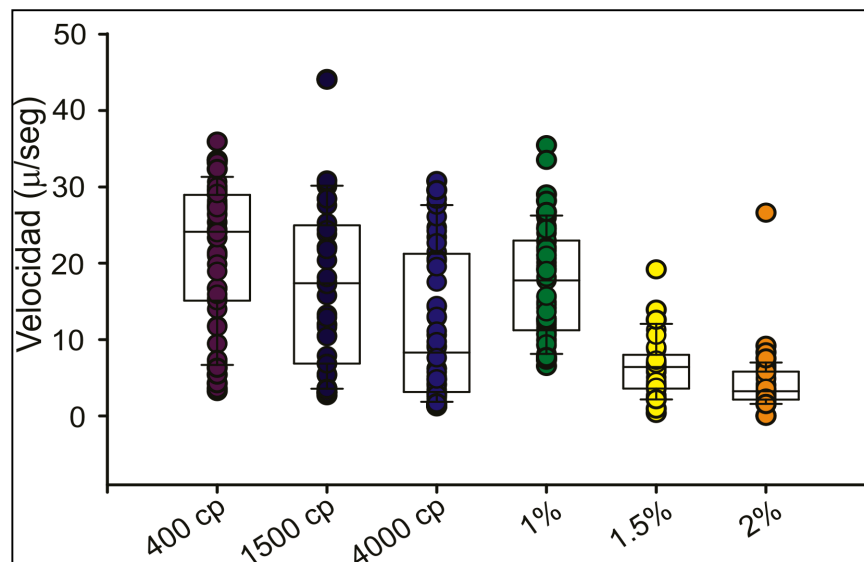


Figura A1. VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$) de espermatozoides de humano capacitados nadando en soluciones de diferente viscosidad medidas por microscopía. En la gráfica se puede observar la distribución de las velocidades en los distintos medios (puntos de colores), y las cajas, que representan los cuartiles de la distribución. También se pueden observar los valores atípicos, que posiblemente sean espermatozoides hiperactivados.

La VCL de los espermatozoides disminuyó conforme a la viscosidad del medio que contiene metilcelulosa y la de poliacrilamida incrementó, como se puede observar en la **Tabla 1** y **Figura 1**. La VCL en los medios de poliacrilamida al 1.5% y 2% disminuyó notablemente.

Tabla A1. VCL de espermatozoides nadando en soluciones de alta viscosidad (análisis de datos con ImageJ-MTrackJ)

	Metilcelulosa			Poliacrilamida		
	400 cP	1500 cP	4000 cP	1%	1.5%	2%
Promedio (µm/seg)	21.4	17.0	11.8	17.4	6.4	4.2
ES (µm/seg)	1.2	1.6	1.3	0.9	0-7	0.6
DS (µm/seg)	9.1	10.3	9.7	7.2	4.0	4.0
N	4	5	5	3	3	4
n	55	42	52	59	33	46

Al hacer el análisis estadístico (ANOVA) se obtuvieron los resultados de la **Tabla 2**.

Tabla A2. Análisis estadístico de la VCL de espermatozoides nadando en soluciones de alta viscosidad

	400 cP	1500 cP	4000 cP	1%	1.5%	2%
400 cP	-	N.S.	$P \leq 0.001$	N.S.	$P \leq 0.001$	$P \leq 0.001$
1500 cP		-	$P \leq 0.05$	N.S.	$P \leq 0.001$	$P \leq 0.001$
4000 cP			-	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.001$
1%				-	$P \leq 0.001$	$P \leq 0.001$
1.5%					-	N.S.
2%						-

En la **Figura 1** se pueden observar las distribuciones de la velocidad curvilínea en las diferentes soluciones y en el diagrama se puede ver cómo el rango de velocidades se va reduciendo a medida que las viscosidades van aumentando. Las distribuciones también se ven reducidas en las soluciones de poliacrilamida, además el rango de velocidades en que nada el espermatozoide disminuye a medida que aumenta la concentración del medio de poliacrilamida. En las distribuciones de las soluciones de metilcelulosa 1500 cP, y en todas las de

poliacrilamida se observan puntos atípicos, éstos solo se observan a altas velocidades, por lo que este comportamiento puede estar relacionado con espermatozoides hiperactivados.

Además de las distribuciones, se analizaron las frecuencias de las velocidades de los espermatozoides nadando en diferentes soluciones (**Figura 2**). Se puede observar que en la solución de 400 cP, la mayoría de los espermatozoides nadan a velocidades de 25-30 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Sin embargo, con la solución de 1500 cP la distribución es más homogénea. Por otro lado, con la solución de 4000 cP y las de poliacrilamida las distribuciones presentan dos poblaciones, las que se presentan con mayor frecuencia a velocidades bajas (por debajo de 10 $\mu\text{m}/\text{seg}$) y la otra de mucho menor frecuencia en velocidades mas altas.

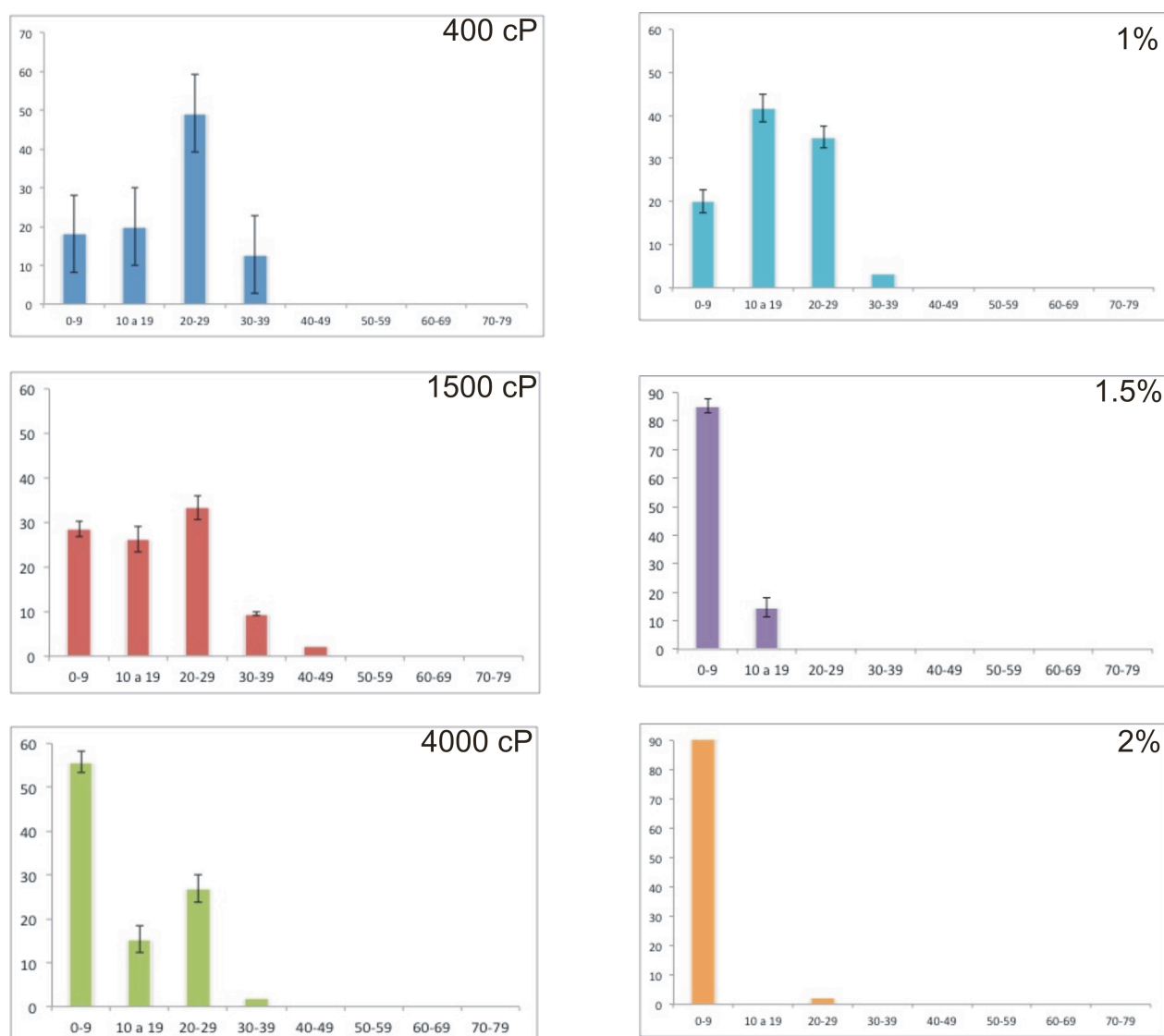


Figura A2. Distribución de frecuencias de las velocidades de nado de espermatozoides de humano en distintas soluciones viscosas medidas por microscopía. En la fila izquierda se encuentran las frecuencias de las velocidades obtenidas de los espermatozoides nadando en soluciones de metilcelulosa. En la fila derecha se muestran las frecuencias de los espermatozoides en soluciones de poliacrilamida.

2. Velocidad curvilínea de los espermatozoide de humano nadando en soluciones de alta viscosidad medida con el sistema CASA

En este apartado se midió la velocidad curvilínea de espermatozoides capacitados y no capacitados en los medios viscosos y en el medio control. Con el sistema CASA se pueden obtener más datos y con una mayor cantidad de células en muy poco tiempo, por lo que decidimos utilizarlo para probar todas las viscosidades.

En la **Figura 3** se muestran las frecuencias relativas que se obtuvieron de los promedios de la velocidad curvilínea de los experimentos realizados con espermatozoides capacitados en el medio control (con viscosidad similar al agua: 1 cP), los medios de metilcelulosa (400 cP, 1500 cP y 4000 cP) y los medios de poliacrilamida (1%, 1.5% y 2%). En general se observaron comportamientos en forma de campana de Gauss, pero dependiendo del medio en el que nadaban los espermatozoides cambió el grosor de la campana. El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla A3. VCL de espermatozoides capacitados nadando en soluciones de alta viscosidad (análisis de datos con sistema CASA)

	MEH	Metilcelulosa			Poliacrilamida		
		400 cP	1500 cP	4000 cP	1%	1.5%	2%
Promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	88.53	34.40	29.28	30.09	35.36	31.68	29.44
ES ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	4.28	7.81	1.15	1.37	0.96		0.86
DS ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	10.49	3.14	2.30	2.73	1.92		1.48
N	6	4	4	4	4	2	3

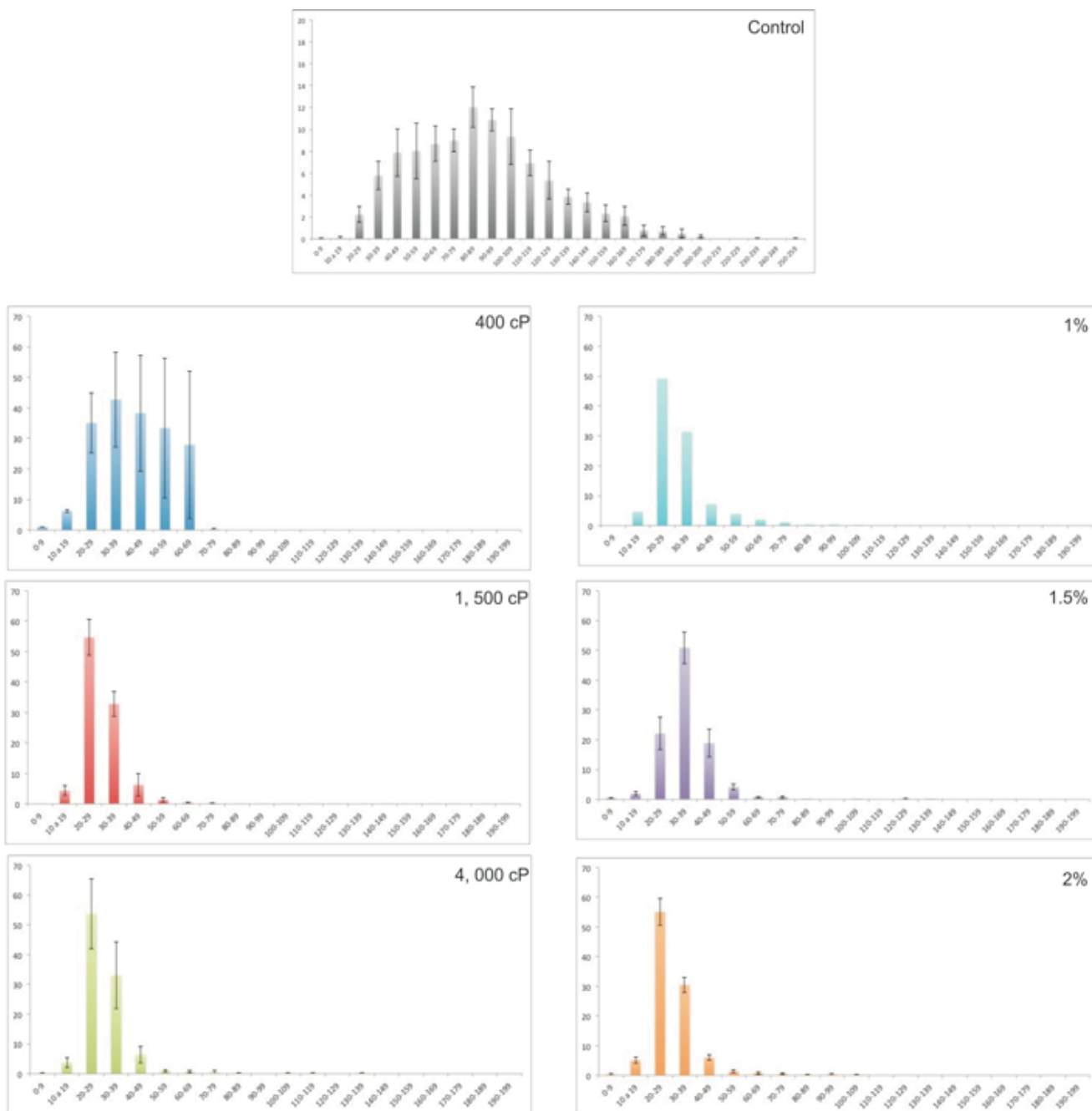


Figura A3. Distribución de frecuencias de la VCL de los espermatozoides capacitados en distintas soluciones viscosas medidas con el sistema CASA. En gris, se encuentran las frecuencias de las velocidades obtenidas de los espermatozoides nadando en la solución control (MEH, medio acuoso). En la fila de la izquierda se muestran las frecuencias de la VCL de espermatozoides nadando en metilcelulosa. En la fila de la derecha se muestran las frecuencias de la VCL de los espermatozoides nadando en poliacrilamida.

Además de los experimentos con espermatozoides capacitados, también observamos la VCL de los espermatozoides no capacitados en las soluciones de metilcelulosa y poliacrilamida (**Figura 4**). El objetivo era conocer si existe alguna diferencia en la velocidad de los espermatozoides que dependa de la capacitación. El resumen de los resultados de muestra en la **Tabla 4**.

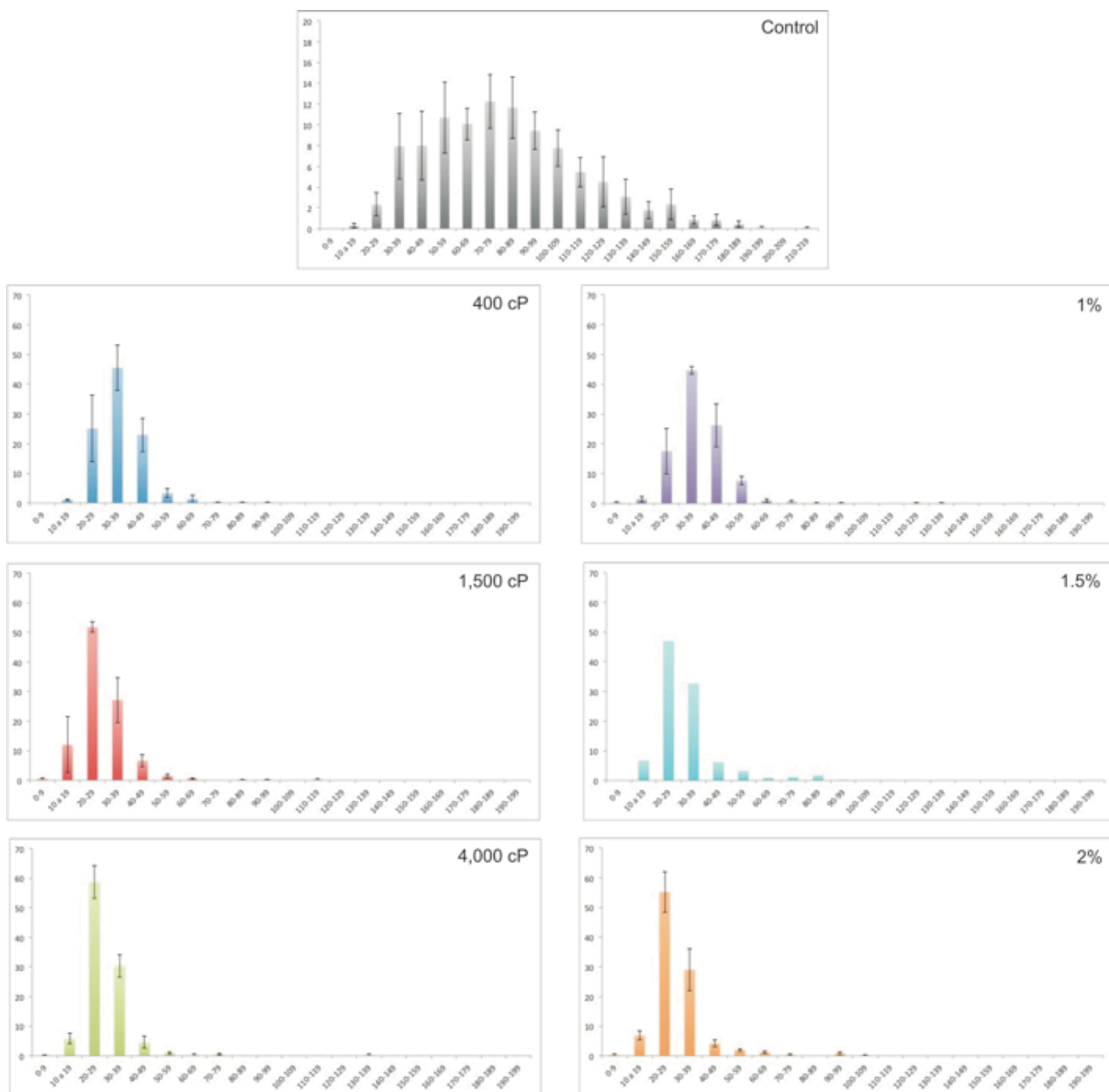


Figura A4. Distribución de frecuencias de la VCL de los espermatozoides no capacitados en distintas soluciones viscosas medidas con el sistema CASA. En gris, se encuentran las frecuencias de las velocidades obtenidas de los espermatozoides nadando en la solución control (MEH, medio acuoso). En la fila de la izquierda se muestran las frecuencias de la VCL los espermatozoides nadando en metilcelulosa. En la fila de la derecha se muestran las frecuencias de la VCL de los espermatozoides nadando en poliacrilamida.

Tabla A4. VCL de espermatozoides no capacitados nadando en soluciones de alta viscosidad (análisis de datos con sistema CASA)

	MEH	Metilcelulosa			Poliacrilamida		
		400 cP	1500 cP	4000 cP	1%	1.5%	2%
Promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	81.56	35.52	30.76	28.85	37.42	31.84	29.35
ES ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	8.58	1.70	0.64	0.94	2.02		1.72
DS ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	19.20	3.40	1.27	1.88	3.50		2.97
N	5	4	4	4	4	2	4

Es importante mencionar que el sistema CASA considera inmóviles a las células que nadan abajo de 5 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y la población de espermatozoides inmóviles incrementa conforme la viscosidad sube. Por esta razón, al comparar los datos anteriores (con microscopía) con los valores obtenidos con el sistema CASA, los últimos son más homogéneos. En parte porque el sistema CASA elimina los espermatozoides que nadan muy lento.

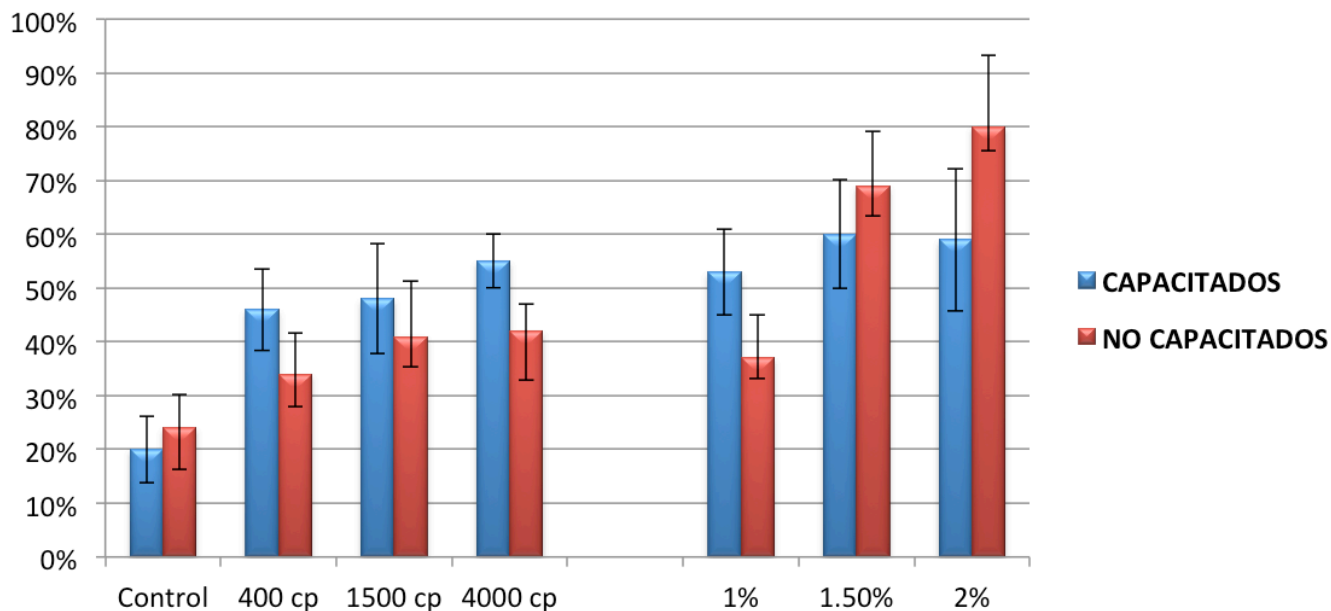


Figura A5. Porcentaje de espermatozoides inmóviles detectados en el sistema CASA (nada por debajo de los 5 $\mu\text{m}/\text{seg}$). En la gráfica se muestra el porcentaje de espermatozoides capacitados (azul) y no capacitados (rojo) que fueron detectados como inmóviles por el sistema CASA. En ningún caso hay diferencias significativas al comparar los espermatozoides capacitados con los no capacitados.

VIII. Bibliografía

- Bedu-Addo, K., Barratt, C.L., Kirkman-Brown, J.C., and Publicover, S.J. (2007). Patterns of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 302, 324-332.
- Blackmore, P.F. (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5, 531-538.
- Blackmore, P.F., Beebe, S.J., Danforth, D.R., and Alexander, N. (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265, 1376-1380.
- Blackmore, P.F., and Eisoldt, S. (1999). The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 5, 498-506.
- Brinton, R.D., Thompson, R.F., Foy, M.R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C.E., Morgan, T.E., Pike, C.J., Mack, W.J., Stanczyk, F.Z., *et al.* (2008). Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29, 313-339.
- Carlson, A.E., Westenbroek, R.E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D.E., Hille, B., Garbers, D.L., and Babcock, D.F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14864-14868.
- Chung, J.J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2, 153.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., and De Mayo, F.J. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 179, 97-103.
- Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., *et al.* (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16, 231-245.
- Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J.J., Hernandez-Cruz, A., and Trevino, C.L. (2006). T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium* 40, 241-252.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Trevino, C.L., Felix, R., and Beltran, C. (2005). Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 243, 79-172.
- 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.
- Eddy, E.M., and O'brian, D.A. (1994). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, and J.D. Neil, eds. (New York, Raven Press), pp. 29-77.
- Eddy, E.M., Toshimori, K., and O'Brien, D.A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 61, 103-115.

- Ellis-Davies, G.C. (2007). Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* 4, 619-628.
- Foresta, C., Rossato, M., and Di Virgilio, F. (1993). Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J* 294 (Pt 1), 279-283.
- Foresta, C., Rossato, M., and Di Virgilio, F. (1995). Differential modulation by protein kinase C of progesterone-activated responses in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 408-413.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 161, 79-88.
- Garcia, M.A., and Meizel, S. (1999). Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol Reprod* 60, 102-109.
- Gilbert, S.F. (2006). *Developmental Biology*, 8 edn (Sunderland, Sinauer Associates).
- Gosden, R., and Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: our obscure origin. *J Clin Invest* 120, 973-983.
- Guidobaldi, H.A., Teves, M.E., Unates, D.R., Anastasia, A., and Giojalas, L.C. (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS ONE* 3, e3040.
- Guzman-Grenfell, A.M., and Gonzalez-Martinez, M.T. (2004). Lack of voltage-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterone in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *Journal of Andrology* 25, 117-122.
- 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 [Ca²⁺]_i oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 279, 46315-46325.
- Harper, C.V., Cummeron, J.A., White, M.R., Publicover, S.J., and Johnson, P.M. (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci* 121, 2130-2135.
- Harper, C.V., Kirkman-Brown, J.C., Barratt, C.L., and Publicover, S.J. (2003). Encoding of progesterone stimulus intensity by intracellular [Ca²⁺]_i in human spermatozoa. *Biochem J* 372, 407-417.
- Ho, H.C., Granish, K.A. and Suarez, S.S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250, 208-217.
- Ho, H.C., and Suarez, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122, 519-526.
- Ho, H.C., and Suarez, S.S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68, 1590-1596.
- Ho, K., Wolff, C.A., and Suarez, S.S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev* 21, 345-350.

- Jaiswal, B.S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., and Eisenbach, M. (1999). Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? *Biol Reprod* 60, 1314-1319.
- Kaupp, U.B., Kashikar, N.D., and Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 70, 93-117.
- Kilic, F., Kashikar, N.D., Schmidt, R., Alvarez, L., Dai, L., Weyand, I., Wiesner, B., Goodwin, N., Hagen, V., and Kaupp, U.B. (2009). Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of progesterone. *J Am Chem Soc* 131, 4027-4030.
- Kirkman-Brown, J.C., Barratt, C.L., and Publicover, S.J. (2003). Nifedipine reveals the existence of two discrete components of the progesterone-induced $[Ca^{2+}]_i$ transient in human spermatozoa. *Dev Biol* 259, 71-82.
- Kirkman-Brown, J.C., Barratt, C.L., and Publicover, S.J. (2004). Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem J* 378, 827-832.
- Kirkman-Brown, J.C., Bray, C., Stewart, P.M., Barratt, C.L., and Publicover, S.J. (2000). Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 222, 326-335.
- Kirkman-Brown, J.C., Punt, E.L., Barratt, C.L., and Publicover, S.J. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23, 306-315.
- Lindemann, C.B., and Lesich, K.A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 123, 519-528.
- Lishko, P.V., Botchkina, I.L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature* 471, 387-391.
- Liu, J., Xia, J., Cho, K.H., Clapham, D.E., and Ren, D. (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* 282, 18945-18952.
- Losel, R., Breiter, S., Seyfert, M., Wehling, M., and Falkenstein, E. (2005). Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* 37, 10-14.
- Makler, A. (1978). A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril* 30, 313-318.
- Mayer, G., and Heckel, A. (2006). Biologically active molecules with a "light switch". *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 4900-4921.
- Meizel, S., and Turner, K.O. (1991). Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 77, R1-5.
- Meizel, S., Turner, K.O., and Nuccitelli, R. (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 182, 67-75.
- Molecular-Probes (2005). *Fluo Calcium Indicators*, pp. 5.
- MolecularProbes (2008). *Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters*, pp. 3.
- Mortimer, S.T. (2000). CASA--practical aspects. *J Androl* 21, 515-524.

- Mortimer, S.T., and Mortimer, D. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 11, 195-203.
- Naz, R.K., and Sellamuthu, R. (2006). Receptors in spermatozoa: are they real? *J Androl* 27, 627-636.
- Nishigaki, T., Wood, C.D., Shiba, K., Baba, S.A., and Darszon, A. (2006). Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *Biotechniques* 41, 191-197.
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., and Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 828-833.
- Phillips, D.M. (1972). Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J Cell Biol* 53, 561-573.
- 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.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., and Clapham, D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.
- Riffell, J.A., and Zimmer, R.K. (2007). Sex and flow: the consequences of fluid shear for sperm-egg interactions. *JEB* 210, 3644-3660.
- Sabeur, K., Edwards, D.P., and Meizel, S. (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 54, 993-1001.
- Schmidt, R., Geissler, D., Hagen, V., and Bendig, J. (2007). Mechanism of photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl esters. *J Phys Chem A* 111, 5768-5774.
- Servín-Vences, R. (2009). Evaluación de tres análogos fotoactivables de progesterona en la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano. In *Genética del desarrollo y Fisiología Molecular*, IBt (Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México), pp. 55.
- Smith, D.J., Gaffney, E.A., Gadelha, H., Kapur, N., and Kirkman-Brown, J.C. (2009). Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 220-236.
- Stauss, C.R., Votta, T.J., and Suarez, S.S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster Zona Pellucida. *Biol Reprod* 53, 1280-1285.
- Strunker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N.D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature* 471, 382-386.
- Suarez, S.S. (1996). Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 17, 331-335.
- Suarez, S.S. (2008a). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*.
- Suarez, S.S. (2008b). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14, 647-657.
- Suarez, S.S., and Dai, X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 46, 686-691.

- Suarez, S.S., Katz, D.F., Owen, D.H., Andrew, J.B., and Powell, R.L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44, 375-381.
- Suarez, S.S., and Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 12, 23-37.
- Suarez, S.S., Varosi, S.M., and Dai, X. (1993). Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4660-4664.
- Tanii, I., Aradate, T., Matsuda, K., Komiya, A., and Fuse, H. (2011). PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. *Reproduction* 141, 163-171.
- Tesarik, J., Moos, J., and Mendoza, C. (1993). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133, 328-335.
- 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.
- Thomas, P., and Meizel, S. (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca²⁺ influx. *Biochem J* 264, 539-546.
- Thomas, P., Tubbs, C., and Garry, V.F. (2009). Progesterone functions in vertebrate gametes mediated by membrane progesterone receptors (mPRs): Identification of mPR α on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids* 74, 614-621.
- Turner, K.O., and Meizel, S. (1995). Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 774-780.
- Turner, R.M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 18, 25-38.
- Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D., and de Kruif, A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim* 37, 144-151.
- 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.
- Wang, H., Liu, J., Cho, K.H., and Ren, D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* 81, 539-544.
- Wassarman, P.M. (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* 204, 388-391.
- Wassarman, P.M., and Albertini, D.F. (1994). The Mammalian Ovum. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, and J.D. Neil, eds. (New York, Raven Press), pp. 79-122.
- WHO (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 2 edn (New York, Cambridge University Press).

- Wistrom, C.A., and Meizel, S. (1993). Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 159, 679-690.
- Wood, C.D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S.A., Whitaker, M., and Darszon, A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol* 306, 525-537.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, and J.D. Neil, eds. (New York, Raven Press), pp. 189-317.
- Zimmer, R.K. and Riffell, J.A. (2011). Sperm chemotaxis, fluid shear, and the evolution of sexual reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13200-13205.