



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CAPACITACIÓN DE LOS
ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

Tesis que para obtener el título de Bióloga

P R E S E N T A:

Zandibel Díaz Rebollar

Director de tesis: Dr. Víctor Manuel Torres Flores

Asesora: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Lugar de adscripción: Facultad de Medicina, UNAM



México D.F

JUNIO 2015



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.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **DÍAZ REBOLLAR ZANDIBEL**, con número de cuenta **305271398**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **23 de junio de 2015** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Biól. **MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ**

VOCAL Dr. **VÍCTOR MANUEL TORRES FLORES***

SECRETARIO Dra. **PATRICIA ROSAS SAUCEDO**

SUPLENTE Dr. **JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**

SUPLENTE Dr. **EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ**

M. C. A. Rosas Saucedo

V. M. Torres Flores

J. J. Rodríguez Mercado

E. Ledesma Martínez

J. Rosas Saucedo

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la temperatura en la capacitación de los espermatozoides humanos.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

México, D. F., a 04 de junio de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR

ZARAGOZA

DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. **ARMANDO CERVANTES SANDOVAL**
JEFE DE CARRERA

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor M. Torres Flores en el laboratorio de Biomembranas del departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.

Con apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el número IA203114.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Vallejo que me abrió las puertas y me brindó la oportunidad de ser parte de ella, permitiéndome alcanzar mis metas.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por apoyarme en cuanto a biblioteca, laboratorios, reactivos, y materiales que se me otorgaron para concluir mis estudios.

A mi director de tesis, Dr. Víctor Manuel Torres Flores por haber confiado en mí, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, gracias por dedicar su valioso tiempo en la revisión, corrección y por compartir sus conocimientos para enriquecerlo. Además de proporcionarme el espacio y equipo para concluir este proyecto.

A la M. en C. Yadira Hernández Rueda por su apoyo para la realización del análisis estadístico y guiarme desde el primer día que comencé con este proyecto.

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por dedicar tiempo para la revisión y corrección de esta tesis.

A cada uno de los miembros del jurado: por sus valiosas aportaciones y sugerencias para la mejora y culminación de esta tesis.

A mis hermanos: Juan y Pedro que me han acompañado en el transcurso de mi vida, y me han demostrado que las cosas se pueden lograr. La vida ha sido generosa conmigo al regalarme hermanos como ustedes, con los que he vivido tantas cosas buenas, malas y hasta tristes. Pero esto hace más fuerte el lazo que nos mantiene unidos. Estoy muy agradecida porque me han inspirado a obtener uno de mis principales objetivos.

A I liana Briseño y Hugo Briseño por la confianza que me brindaron, por incluirme en su familia y por su apoyo incondicional.

A la Sra. Nieves Rojas y a la familia Morales Rojas gracias por su apoyo, sus consejos, cariño y su confianza.

Contenido

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Estructura del gameto masculino	3
1.2 Maduración del espermatozoide	6
1.2.1 Maduración en el epidídimo	6
1.2.2 Maduración en el tracto genital femenino	7
1.3 Movilidad espermática	8
1.4 Capacitación espermática	8
1.5 Reacción acrosómica	10
1.6 Canales de membrana, moléculas y factores implicados en el proceso de capacitación	11
1.6.1 Importancia del Ca^{2+} en la capacitación	11
1.6.2 Bicarbonato	13
1.6.3 Potencial de membrana	13
1.6.4 Quimiotaxis y termotaxis	14
1.7 Antecedentes	16
II. JUSTIFICACIÓN	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19

V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Material y medios.....	20
5.2 Purificación de los espermatozoides.....	20
5.3 Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ con Fura-ff AM	21
5.3.1 Calibración de la $[Ca^{2+}]_i$	22
5.4 Determinación del potencial de membrana	23
5.4.1 Calibración del potencial de membrana	24
5.5 Determinación de pH_i	26
5.6 Ensayos de movilidad	27
5.7 Análisis estadístico	29
VI. RESULTADOS	30
6.1 Efecto de la temperatura sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con progesterona.....	30
6.2 Efecto de la temperatura sobre el potencial de membrana de los espermatozoides humanos capacitados.....	32
6.3 Efecto de la temperatura sobre el pH_i en espermatozoides humanos capacitados.....	34
6.4 Efecto de la temperatura sobre la movilidad de los espermatozoides humanos.....	35
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. PERSPECTIVAS	55
X. BIBLIOGRAFÍA	56
XI. ANEXOS	64

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide humano.....	4
Figura 2. Vías de señalización en la capacitación del espermatozoide.....	10
Figura 3. Mecanismos de orientación del espermatozoide humano en el tracto genital femenino.....	16
Figura 4. Incubación de los espermatozoides humanos.....	22
Figura 5. Calibración de la señal de calcio.....	23
Figura 6. Representación esquemática del sistema óptico para las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$ y de potencial de membrana.....	24
Figura 7. Calibración del potencial de membrana.....	25
Figura 8. Calibración de la señal de pH_i	26
Figura 9. Representación esquemática de los parámetros cinéticos muestreados por el CASA.....	28
Figura 10. Digitalización de la imagen de la cabeza del espermatozoide.....	29
Figura 11. Efecto de la incubación (0, 2, 4 h) a diferente temperatura (25-28 °C y 37 °C) sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides no capacitados y capacitados inducido con 4 μ M de progesterona.....	30
Figura 12. Efecto de la temperatura sobre el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos capacitados.....	32
Figura 13. Efecto de la temperatura en el potencial de membrana en espermatozoides capacitados y no capacitados.....	33
Figura 14. Efecto de la incubación de 0, 2, y 4 h a diferente temperatura (25–28 °C y 37 °C) sobre el pH_i en espermatozoides capacitados y estimulados con 4 μ M de progesterona.....	34
Figura 15. pH_i en espermatozoides capacitados a temperatura ambiente y a 37 °C.	35
Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la velocidad curvilínea de los espermatozoides capacitados.....	36
Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la velocidad rectilínea en los espermatozoides capacitados.....	37
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la trayectoria media en espermatozoides humanos capacitados.....	38
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la linealidad en espermatozoides capacitados.....	39
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la rectitud de la trayectoria media en espermatozoides humanos capacitados.....	40
Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides humanos capacitados.....	41
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de batido flagelar en espermatozoides humanos capacitados.....	42
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la movilidad total de espermatozoides capacitados humanos.....	43
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre el movimiento progresivo en espermatozoides humanos capacitados.....	44
Figura 25. Efecto de la temperatura sobre el área que recorrieron los espermatozoides humanos capacitados.....	45
Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la elongación en los espermatozoides humanos capacitados.....	46
Tabla 1. Representa las medidas registradas por el CASA en los experimentos realizados a una temperatura de 37 °C y a temperatura ambiente en un periodo de incubación de 4 h con espermatozoides capacitados.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Acs	Adenilato ciclasa soluble
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BCECF- AM	2'7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y6)-carboxifluorescencia, acetoximetil éster
BSA	Albúmina sérica bovina
[Ca²⁺]_i	Concentración del ión Ca ²⁺ intracelular
Ca²⁺	Ión calcio
Ca_v	Canales de calcio dependientes de voltaje
CaCl₂	Cloruro de calcio
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
EGTA	Etilenglicol-bis(-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acetato
Fura ff – AM	Fura ff acetoximetil ester
[HCO₃⁻]_i	Concentración de bicarbonato intracelular
HEPES	N-(2-hidroxietyl) piperizina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
HSM	Medio de Hepes para espermatozoide humano
Mg₂Cl	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μm	Micrometros
μM	Micromolar
mV	Milivolts

NaCl	Cloruro de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato ácido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nM	Nanomolar
Percoll	Sílica recubierta de polivinilpirrolidona coloidal
pH_i	pH intracelular
RA	Reacción acrosómica
Rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

La capacitación espermática es un proceso fisiológico que se desarrolla en el aparato reproductor femenino y es indispensable para que la fecundación del ovocito pueda realizarse. Este proceso requiere inicialmente de la eliminación de los factores descapacitantes presentes en el semen; así como una serie de cambios en el espermatozoide tanto lipídicos como proteicos de su membrana celular, activación de canales iónicos, la fosforilación-desfosforilación proteica, activación de enzimas. Todos estos son regulados por diferentes vías, varias de las cuales se desconocen o no están totalmente descritas.

La temperatura es un factor que se encuentra sometido a muchas variaciones durante condiciones *in vitro*, por lo tanto es importante analizar el comportamiento de los espermatozoides que son capacitados a temperatura ambiente del laboratorio (25–28 °C).

En este trabajo se realizaron experimentos para determinar el efecto de la temperatura sobre la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana, pH_i y movilidad en espermatozoides capacitados *in vitro*. Las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana, pH_i fueron analizadas con espectrometría de fluorescencia; mientras que la movilidad se examinó mediante el sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA) de la marca Hamilton-Thorn.

Los resultados indicaron que los espermatozoides capacitados *in vitro* incubados a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los espermatozoides incubados a 37 °C al realizar las mediciones sobre la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana, pH_i durante 4 h. Sin embargo la movilidad de los espermatozoides tuvo diferencias significativas en la estadística descriptiva.

I. INTRODUCCIÓN

La fecundación tiene como resultado la formación de un nuevo individuo a partir de la fusión pronuclear de los gametos femenino y masculino. Se puede definir como el conjunto de transformaciones que se producen en los dos gametos a partir de la interacción y fusión de ambos (Wallace *et al.*, 1983).

En su camino hacia el ovocito el espermatozoide presenta diferentes cambios como son la capacitación, hiperactivación de la movilidad y reacción acrosómica (RA). Estos procesos son necesarios para que el espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito y fecundarlo. La capacitación ocurre en el tracto genital femenino y puede reproducirse *in vitro* en medios fisiológicos que contengan bicarbonato y albúmina. Este proceso, dura de 4-6 horas, y durante este periodo ocurren cambios bioquímicos y biofísicos, entre los que destacan: un cambio en el potencial de reposo de la membrana celular como resultado de la salida de potasio, eliminación de colesterol por la albumina estimulando la entrada de bicarbonato y calcio. Estos iones promueven la actividad de la adenilato ciclasa, que produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir de AMP. El aumento en AMPc activa a la proteína cinasa A, causando que esta active a la proteína tirosina cinasa. Simultáneamente el pH intracelular (pH_i) se alcaliniza de 6.7 a 6.85 aproximadamente y la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el reposo aumentan en alrededor de 100 nM (Torres-Flores *et al.*, 2011).

Estos procesos están limitados por distintos factores que rodean su entorno como por ejemplo: secreciones del aparato reproductor femenino, plasma seminal, grado de acidez del medio y temperatura (Bahat y Eisenbach, 2006).

La temperatura es un factor que influye sobre los procesos relacionados con la fertilización. Sin embargo, el efecto de la incubación a temperatura ambiente en la capacitación del espermatozoide humano no ha sido completamente descrito.

A continuación se describen las características morfológicas del espermatozoide y la maduración espermática que debe de llevar a cabo para poder fecundar al ovocito.

1.1 Estructura del gameto masculino

El espermatozoide está formado por: una cabeza y por un flagelo o cola. A su vez estas partes están divididas en compartimientos celulares, cada uno con su función (Curry y Watson, 1995).

Cabeza del espermatozoide

La cabeza del espermatozoide cuenta con tres partes fundamentales: el acrosoma, el núcleo y el citoplasma (de forma muy reducida) (Browder *et al.*, 1991).

El **acrosoma** es una vesícula grande que se encuentra en la parte apical de la cabeza. Dentro de esta estructura se encuentran enzimas hidrolíticas; estas enzimas se liberan mediante la exocitosis del acrosoma, proceso conocido como reacción acrosómica (Mortimer, 1997).

El **núcleo** espermático contiene el ADN, este aparece muy condensado debido a que durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas. El núcleo espermático es la parte que debe de penetrar en el ovocito (Miller y Ostermeier, 2006).

Los espermatozoides maduros tienen un **citoplasma** muy reducido. La mayor pérdida del citoplasma se produce cuando los espermatozoides se van a liberar del epitelio de los túbulos seminíferos (Schuel y Burkman, 2005).

Flagelo del espermatozoide

El flagelo es el encargado de la movilidad espermática y se divide en cuatro regiones: cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal, cada una con diferente anatomía relacionada con su función (Browder *et al.*, 1991).

El axonema o filamento axial se extiende a lo largo de todo el flagelo a través de las cuatro regiones y es la estructura responsable de la movilidad (Figura 1). El axonema se encuentra organizado con el patrón 9+2, es decir dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos formados por dos subunidades; la subunidad A completa y la B incompleta. El componente estructural de los microtúbulos es la tubulina (Olivera *et al.*, 2006).

Extendiéndose desde cada túbulo A hacia el túbulo B del doblete adyacente hay pares de proyecciones de dineína y a su vez los nueve dobletes periféricos están conectados cada uno a su vecino inmediato por una proteína compuesta, la nexina (Figura 1).

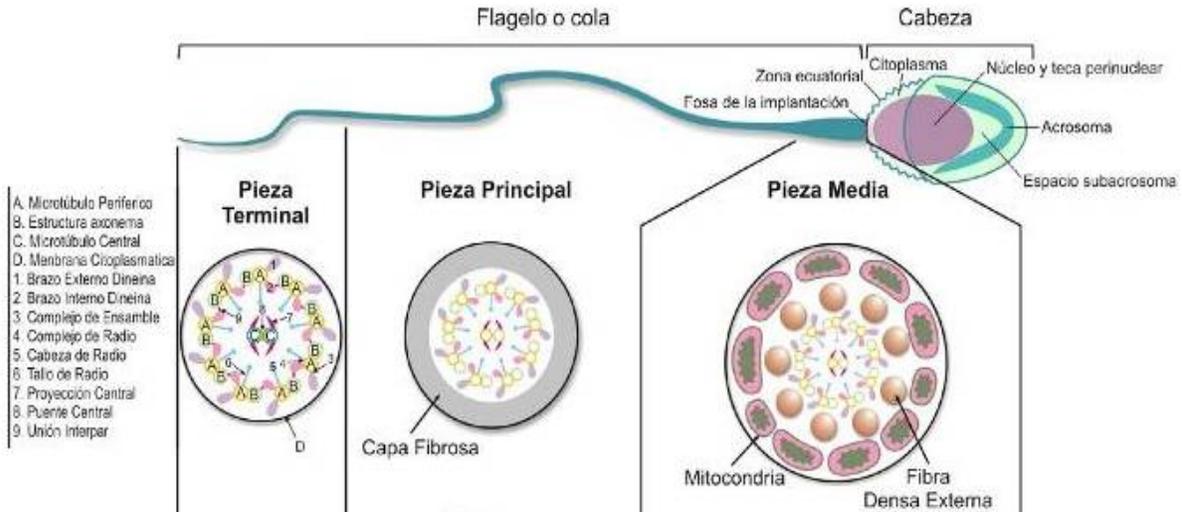


Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide humano. Representa el cuerpo entero del espermatozoide dividido en dos partes: cabeza y flagelo. A su vez estas partes están divididas en compartimentos celulares (Modificado de Olivera *et al.*, 2006).

El **cuello** forma un segmento que liga el flagelo y la cabeza. Sus principales componentes son *capitulum* (una estructura fibrosa con forma de cúpula) y las

columnas segmentadas. El *capitulum* es el sitio donde se posiciona el centriolo proximal, en ángulo recto al eje del flagelo. La unión entre la cabeza y la cola esta mediada por filamentos de *capitulum* y la placa basal en la superficie caudal del núcleo, permitiendo flexibilidad al cuello (Wallace *et al.*, 1983).

La **pieza media** se extiende desde el extremo distal del cuello hasta el *annulus*, una banda circunferencial que marca la unión de la pieza media y la pieza principal. La característica más importante de la pieza media es la presencia de la vaina mitocondrial que consiste en mitocondrias cubriendo de punta a punta el axonema en forma helicoidal. El espermatozoide humano tiene una hélice compuesta de 11 a 15 giros, con un promedio de dos mitocondrias en cada giro (Harrison, 1996). En realidad, la vaina mitocondrial del espermatozoide humano a menudo tiene una apariencia desorganizada en contraste con la observada en otras especies de mamíferos. La estructura interna mitocondrial es similar a la observada en otros tipos celulares, sin embargo las mitocondrias espermáticas son inusuales en cuanto a la gran estabilidad de sus membranas externas. La gran estabilidad de las mitocondrias a cambios osmóticos y tratamientos con detergentes podría estar relacionada con la presencia de puentes disulfuro (Wallace *et al.*, 1983). La significancia funcional de esta alta estabilidad aun no es clara pero serviría para resistir la compresión y el estiramiento durante el batido flagelar. La membrana interna de la mitocondria es el sitio de producción de energía de los espermatozoides y la posición de las mitocondrias alrededor del flagelo favorece el rápido suministro de ATP al axonema para la movilidad espermática (Mbizvo *et al.*, 1990).

El segmento más largo del flagelo es la **pieza principal**, que se extiende desde el *annulus* hasta el extremo proximal de la pieza terminal, con un largo de aproximadamente 55 μm . Se caracteriza por la presencia de la vaina fibrosa, un citoesqueleto alrededor del axonema y las fibras densas externas. Las proteínas que constituyen la vaina fibrosa contienen gran cantidad de puentes disulfuro, convirtiéndola en una estructura sumamente estable. La función de la vaina fibrosa

sería similar o complementaria a la de las fibras densas externas, controlando y restringiendo el movimiento flagelar (Curry y Watson, 1995).

Más allá del extremo de la vaina fibrosa se encuentra la **pieza terminal** del flagelo. Los microtúbulos del axonema terminan en esta región, siguiendo un patrón regular aunque con variaciones. Primero los brazos de dineína desaparecen y la subunidad A toma apariencia de hueco (Pedersen, 1972) y al terminar los microtúbulos centrales, dos pares externos se mueven hacia adentro para ser rodeados por el resto. Luego hay una sucesiva terminación de los túbulos que se van quedando en la punta del flagelo (Curry y Watson, 1995).

1.2 Maduración del espermatozoide

La maduración del espermatozoide se ha definido como la capacidad de los espermatozoides para poder fecundar al ovocito; esta maduración comienza en el epidídimo y termina en el tracto genital femenino (Schuel y Burkman, 2005).

1.2.1 Maduración en el epidídimo

Después de haber concluido la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos (espermiación). Sin embargo, aún carecen de movilidad. Para adquirirla, deben someterse a una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, que se realizan en su paso por el epidídimo al que llegan a través del conducto eferente mediante movimientos peristálticos (Phillips, 1970).

Durante el paso entre la cabeza y la cola del epidídimo, los espermatozoides adquieren movilidad a través de un mecanismo de fosforilación y des-fosforilación de proteínas presentes en el flagelo del espermatozoide, reguladas por mediadores intracelulares como ión calcio (Ca^{2+}), AMPc y el pH, procedente del microambiente del epidídimo (Tash y Bracho, 1994). Sin embargo, las principales

modificaciones incluyen cambios en la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática (Sullivan *et al.*, 2005; Yanagimachi, 1994).

1.2.2 Maduración en el tracto genital femenino

Durante el trayecto, los espermatozoides van adquiriendo gradualmente la movilidad y capacidad fertilizante (Foldes y Bedford, 1982). Después de la eyaculación, el semen forma un gel, que se licúa de 20-30 minutos, por medio de unas enzimas originadas en la glándula prostática. Para proteger temporalmente a los espermatozoides del pH ácido vaginal, al cabo de unas horas, los espermatozoides que no han alcanzado el moco cervical, son inmovilizados. El pH de la secreción mucosa cervical es alcalino, permitiendo la supervivencia de los espermatozoides que pueden acceder a él, después de la eyaculación (Ralt *et al.*, 1991). Esta secreción ayuda a eliminar espermatozoides anormales, la selección de espermatozoides móviles, eliminación del plasma seminal y por lo tanto la iniciación de la capacitación. El estrecho contacto entre el espermatozoide y el moco cervical, rico en albúmina servirá, en primer lugar, para eliminar los factores descapacitantes y, en segundo lugar, la pérdida de varios lípidos de membrana como el colesterol; estos dos eventos dan lugar a la capacitación (Feki *et al.*, 2004).

Las contracciones uterinas y la movilidad espermática impulsan a los espermatozoides hacia la unión útero tubárica. En esta región, las secreciones mucosas rellenan su interior, formando una barrera que impide cualquier retroceso (Dobronski *et al.*, 1997).

Las trompas de Falopio proporcionan un entorno propicio para, en primer lugar, el transporte del espermatozoide, el almacenamiento y la capacitación y, en segundo lugar, la captación ovocitaria, su trasporte, fertilización y finalmente la división embrionaria. Todos estos acontecimientos se producen en un periodo relativamente corto del ciclo menstrual, alrededor de la ovulación (Hunter, 1981).

1.3 Movilidad espermática

Los espermatozoides de mamíferos manifiestan dos formas generales de movilidad: activa e hiperactivación. La movilidad activa, se observa en espermatozoides recién eyaculados y muestra un ritmo relativamente bajo de amplitud flagelar que impulsa al espermatozoide por su viaje por el tracto reproductivo femenino (Turner *et al.*, 2006).

Posteriormente los espermatozoides alcanzan un movimiento flagelar aún más vigoroso que juega un papel muy importante en el desplazamiento efectivo a través del moco cervical. Esta aceleración de la movilidad, denominada hiperactivación (Yanagimachi, 1969) se compone de ritmos exagerados, de gran amplitud flagelar causando que los espermatozoides naden en "figura de ocho", formación característica en un medio de baja viscosidad. En medio de alta viscosidad, la movilidad hiperactiva es más progresiva (Ho y Suárez, 2003).

La hiperactivación es importante para la progresión de los espermatozoides a través del entorno de mayor viscosidad del oviducto y, para la penetración del cúmulo del ovocito (Suarez y Dai, 1992; Darszon *et al.*, 2006). Por lo tanto la movilidad es una de las funciones más importantes de los gametos masculinos.

1.4 Capacitación espermática

Los espermatozoides de mamíferos no son capaces de fecundar al ovocito inmediatamente después de la eyaculación, el espermatozoide adquiere su capacidad fecundante después de permanecer en el tracto genital femenino. Este

intervalo entre la liberación de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra y la fecundación se denomina "capacitación" (Suárez y Pacey, 2006).

La capacitación es un proceso de cambios bioquímicos que tienen por objetivo permitir al espermatozoide llevar a cabo la reacción acrosómica, este fenómeno inicia por un eflujo de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides (Blackmore y Eisoldt, 1999). Este eflujo es lento y favorecido por la albúmina. La extrusión de colesterol de la membrana trae como consecuencia un aumento en su fluidez y activación de adenilato ciclasa soluble (ACs) (Clozel *et al.*, 1997). Esta enzima eleva los niveles de AMPc y activa consecuentemente a la proteína cinasa A (PKA) (Chouabe *et al.*, 2000). La ACs, es estimulada por iones de calcio y por bicarbonato (O'toole *et al.*, 2000). Al respecto, cabe mencionar que la capacitación requiere estrictamente de la presencia de calcio extracelular y es estimulada por el bicarbonato. El aumento en el AMPc y la activación de la PKA, trae como consecuencia la activación de tirosinas cinasas (Cui *et al.*, 2004; Czirjak y Enyedi, 2006; Darszon *et al.*, 2006) La actividad de las tirosinas cinasas también es esencial para la capacitación, ya que su inhibición, previene la reacción acrosómica inducida fisiológicamente por la progesterona, lo cual constituye un “marcador funcional” de la capacitación (Figura 2).

Además, la activación de la PKA tiene como resultado la activación de la fosfolipasa D (PLD), la cual estimula a su vez la polimerización de F-actina en humano, murinos y en el carnero, evento que es relacionado con la reacción acrosómica (Cohen *et al.*, 2004).

Entre estos procesos bioquímicos, la capacitación del espermatozoide se acompaña de un aumento en el calcio intracelular de reposo y un cambio en el pH_i (Lotshaw, 2001).

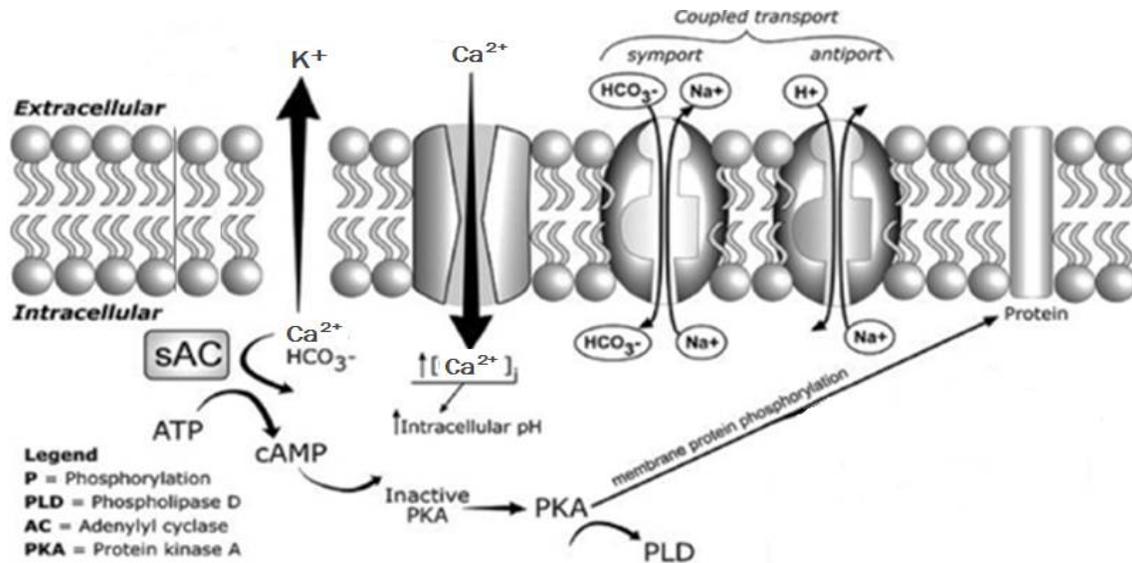


Figura 2. Vías de señalización en la capacitación del espermatozoide. La activación de ACs, mediante el Ca^{2+} y el HCO_3^- , iniciando la vía de AMPc/PKA dando como resultado la fosforilación de las proteínas de membrana (Vadnais *et al.*, 2007).

1.5 Reacción acrosómica

Como resultado de la capacitación, el espermatozoide está preparado bioquímica y morfológicamente para realizar la exocitosis denominada reacción acrosómica, que se inicia cuando el espermatozoide tiene contacto con la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Yanagimachi, 1990). La ZP es la capa externa que rodea al ovocito de los mamíferos y está compuesta de cuatro glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4), de las cuales la ZP3 es la que contiene al inductor fisiológico de la reacción acrosómica del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006).

Permitiendo la liberación de una serie de enzimas y un cambio estructural en la parte anterior de la cabeza espermática; hecho que facilitará la penetración de las cubiertas del ovocito (Buxadé, 1995).

La reacción acrosómica inducida por la ZP o ZP3 requiere de Ca^{2+} externo e involucra: incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ mediados por canales, un aumento en el pH_i y cambios en el potencial de membrana (Darszon *et al.*, 2006).

Aún se desconoce cuál (es) es (son) el(los) receptor(es) de ZP3. Se postula que la unión de la ZP a su(s) receptor(es) dispara cambios en el potencial de membrana (pM) que activan a los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) del espermatozoide maduro. Además de estos cambios, la reacción acrosómica inducida por la ZP requiere de un incremento transitorio de pH_i . Se desconoce todavía cuál es la relación entre el aumento en el pH_i y $[Ca^{2+}]_i$ (López-González *et al.*, 2001).

La hipótesis más aceptada considera que la inducción de la reacción acrosómica por la ZP estimula la entrada de Ca^{2+} a través de los canales T que activa a una fosfolipasa C presente en el espermatozoide. Al activarse la fosfolipasa C se incrementa los niveles de inositoltrifosfato (IP3). El receptor de IP3 está presente en el acrosoma de estas células (Darszon *et al.*, 2011).

1.6 Canales de membrana, moléculas y factores implicados en el proceso de capacitación

1.6.1 Importancia del Ca^{2+} en la capacitación

El Ca^{2+} puede provenir de dos fuentes: 1) extracelular introducido a través de canales de la membrana plasmática y/o 2) Ca^{2+} almacenado en orgánulos intracelulares. La fuente predominante de Ca^{2+} para la hiperactivación es extracelular, incorporándose a través de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática formados por proteínas CatSper (Herrick *et al.*, 2005). Estas proteínas sólo se expresan en células germinales masculinas y se localizan en la pieza principal del flagelo del espermatozoide maduro. Estos canales parecen ser activados mediante el aumento del pH_i (Kirichok *et al.*, 2006).

La movilidad progresiva del espermatozoide es importante en la evaluación del potencial de fertilidad de los espermatozoides, y el requisito previo para la

fertilización. Esta depende de un número de factores, incluyendo la temperatura a la que se mantiene el semen en el momento de los análisis. (Amelar *et al.*, 1980).

El Ca^{2+} tiene la propiedad de ser empleado como regulador por numerosas proteínas celulares. La señal de Ca^{2+} participa en el control de múltiples funciones celulares desde la fertilización hasta los procesos de muerte celular, secreción, metabolismo hasta la diferenciación y replicación celular. De todos los mecanismos de señalización intracelular el más caracterizado y el mejor estudiado es la movilización de Ca^{2+} . Esta vía consiste en aumentos transitorios de la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por numerosos mensajeros intercelulares (Berridge *et al.*, 1999).

La acción del Ca^{2+} sobre distintas enzimas efectoras involucradas en la señal de transducción espermática sugiere que este catión juega un papel importante en la capacitación (Dragileva *et al.*, 1999).

Una de las consecuencias más importantes de la salida del colesterol de las membranas, es una entrada masiva de Ca^{2+} extracelular que se considera requisito indispensable para que el proceso de reacción acrosómica tenga lugar. Esta entrada de Ca^{2+} puede ser consecuencia de los cambios que ocurren en la fluidez de la membrana, lo que confiere que sea más permeable al Ca^{2+} (Flesch y Gadella, 2000).

Visconti y Kopf en 1998, sugirieron un efecto cooperativo del Ca^{2+} y del HCO_3^- en la modulación de la capacitación espermática, es decir, es necesaria la presencia de ambos para que tenga lugar un incremento de los niveles de AMPc y la posterior fosforilación de diversas proteínas.

Otro aspecto que influye en la capacitación en relación con el Ca^{2+} es el pH_i . Los espermatozoides no capacitados mantienen un pH_i acidificado actuando como un regulador del influjo de Ca^{2+} (Florman *et al.*, 1992), previniendo la capacitación y la reacción acrosómica.

Actualmente se cree por la mayoría de los investigadores que el efecto del aumento intracelular de Ca^{2+} , HCO_3^- y el pH_i durante la capacitación espermática es la activación de la ACs posteriormente aumentará el AMPc (Breitbart, 2003; Hess *et al.*, 2005).

1.6.2 Bicarbonato

El HCO_3^- juega un papel importante en la capacitación del espermatozoide y por lo tanto lograr la fecundación tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Harrison *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1995). En el epidídimo hay bajos niveles de HCO_3^- (3-4 mM), pero estos niveles son mayores a en el útero y oviducto (>20 mM) que es el lugar donde tiene lugar la fecundación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1990).

El movimiento del HCO_3^- a través de la membrana ha sido asociado con el incremento del pH_i durante la capacitación (Zeng *et al.*, 1995). Sin embargo, otro objetivo probable del bicarbonato en el espermatozoide es la regulación del metabolismo de AMPc (Garbers *et al.*, 1982) por estímulo de ACs (Buck *et al.*, 1999).

Se ha observado que el bicarbonato provoca una serie de eventos tales como la regulación de los niveles de AMPc, cambios reversibles en la membrana plasmática y la hiperpolarización de esta, por medio de la vía de señalización AMPc/PKA (Harrison, 2004). Por lo tanto se ha determinado que la capacitación es un proceso dependiente de bicarbonato (Gadella y Harrison, 2002; Visconti *et al.*, 2002).

1.6.3 Potencial de membrana

El potencial de membrana basal está determinado por la permeabilidad relativa de la membrana plasmática espermática a los iones que van a constituir el medio de capacitación. Bajo condiciones normales, los espermatozoides mantienen una

concentración de iones en el interior de la célula muy diferente de la que se encuentra en el medio extracelular. La diferencia está determinada por la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones que se encuentran en el medio, de sus gradientes y del estado metabólico de la célula (Salicioni *et al.*, 2007).

La capacitación espermática en los mamíferos está acompañada de una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Zeng *et al.*, 1995), dando como resultado cambios en la actividad de los canales iónicos y transportadores que controlan el flujo iónico (Salicioni *et al.*, 2007). Se ha demostrado que en el espermatozoide de ratón, los cambios en el potencial de membrana no ocurren en ausencia de Albúmina Sérica Bovina (BSA) o de HCO_3^- (Demarco *et al.*, 2003).

Estos resultados sugieren que en un medio de capacitación el HCO_3^- , así como el flujo de colesterol, puede tener la función directa o indirecta controlando eventos que le permiten la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Salicioni *et al.*, 2007).

1.6.4 Quimiotaxis y termotaxis

La probabilidad de un encuentro entre los gametos *in vivo* es muy difícil (Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999) debido a una serie de razones. En primer lugar, el número de espermatozoides eyaculados que alcanzan el istmo del oviducto (donde quedan atrapados y forman un depósito de espermatozoides) es pequeño (Suárez 2002). En segundo lugar, solo una fracción de estos espermatozoides (10% en los seres humanos Cohen *et al.*, 1995) se convierten capacitados y adquieren un estado de preparación para la fertilización del ovocito (Jaiswal y Eisenbach, 2002) en tercer lugar el camino que los espermatozoides recorren en el tracto reproductor femenino para llegar al ovocito en el sitio de la fertilización es relativamente largo 3-5 cm en los seres humanos (Tur-Kaspa, 1992).

Por lo tanto se cree, para alcanzar al ovocito *in vivo*, los espermatozoides deben de ser guiados en el oviducto. Uno de los mecanismos de orientación más comunes es la quimiotaxis. Sin embargo la quimiotaxis por sí sola no puede ser suficiente debido a los movimientos peristálticos del oviducto que pueden prevenir la formación de un gradiente quimioatractivo de largo alcance *in vivo* y restringir la quimiotaxis a una distancia corta del ovocito (Eisenbach, 1999).

Otro mecanismo posible de orientación podría ser la termotaxis. En donde se propone que este mecanismo puede guiar a los espermatozoides por un gradiente de temperatura. Estudios anteriores encontraron que en la ovulación existe una diferencia de temperatura entre el sitio de depósito de espermatozoides (más frío) y el sitio de fertilización (más caliente). Por lo tanto existe una diferencia de temperatura de aproximadamente 2 °C en conejos entre el istmo y la unión ampular-ístmica y -0.7 °C de diferencia en cerdos apareados entre el istmo y la ampolla (Hunter y Nichol, 1986). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la diferencia de temperatura podría servir como señal para guiar a los espermatozoides al sitio de la fecundación (Hunter, 1998).

Posteriormente Bahat et al., (2003) demostraron en espermatozoides de conejo y de humanos que tienen capacidad para detectar pequeñas diferencias de temperatura (tan pequeñas como 0.5 °C y tal vez, incluso inferior) y responden a ella por termotaxis. *In vivo* la termotaxis puede ser complementaria a la quimiotaxis, cada mecanismo puede ser funcional en una región donde el otro mecanismo es ineficaz. Una región es aparentemente entre el depósito de espermatozoides ístmica y el sitio de la fertilización, en donde existe un gradiente de temperatura en la ovulación y donde la quimiotaxis de largo alcance puede no ocurrir debido a un efecto de mezcla de los movimientos peristálticos del oviducto.

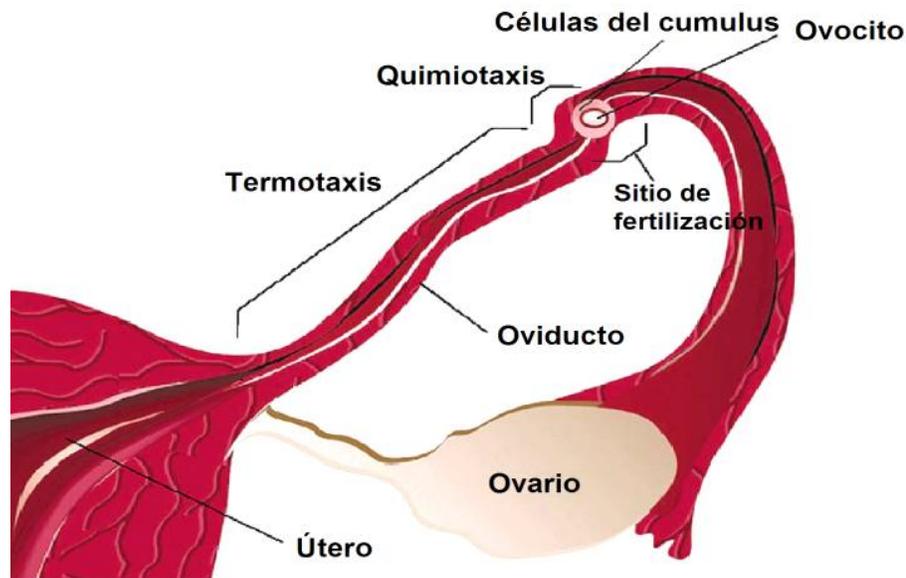


Figura 3. Mecanismos de orientación del espermatozoide humano en el tracto genital femenino. (Bahat y Eisenbach, 2006).

1.7 Antecedentes

Mahi y Yanagimachi en 1973 realizaron experimentos en espermatozoides de hámster dorado en donde los incubaron en un rango de 16 a 42 °C y analizaron los efectos de la temperatura en la movilidad, reacción acrosómica y supervivencia; destacando que en sus resultados a 37 °C se activan inmediatamente los espermatozoides, además que la reacción acrosómica ocurre en mayor porcentaje.

Lenz y colaboradores en 1983 analizaron los efectos de la temperatura sobre la reacción del acrosoma de espermatozoides de bovinos. En sus resultados la reacción del acrosoma y la viabilidad espermática fueron dañadas a 40 °C. Las temperaturas inferiores a 35 °C no mejoraron en estos parámetros. Destacando a 38 °C como temperatura óptima para la reacción del acrosoma. A partir de estos resultados se concluyó que eventos que ocurren antes y durante la fertilización son sensibles a la temperatura.

Experimentos realizados por Si en 1997 con espermatozoides obtenidos del epidídimo caudal del hámster, fueron activados en un medio fisiológico en un rango de temperaturas entre 22 y 40 °C. En sus resultados el aumento de la temperatura incrementó la velocidad de los espermatozoides al nadar y en su batido flagelar. Demostrando que la temperatura regula la iniciación y mantenimiento de la movilidad de los espermatozoides de hámster.

En cuanto a los espermatozoides humanos, algunos informes han descrito cómo la temperatura influye sobre la movilidad celular, en la reacción acrosómica, y en la capacidad del espermatozoide para penetrar en el ovocito.

Como por ejemplo Cohen y colaboradores en 1985 utilizaron los espermatozoides obtenidos de pacientes que se sometieron a la fertilización *in vitro*. Los cuales fueron incubados a temperatura ambiente del laboratorio y a 4 °C durante 20 días, evaluando su movilidad y capacidad de penetración en ovocitos cada dos días realizando evaluaciones durante el día y la noche. Los espermatozoides almacenados a 4 °C durante la noche tenían tasas más altas de penetración del ovocito a comparación con los almacenados a temperatura ambiente del laboratorio. Mientras que a temperatura ambiente, la movilidad se redujo en menos de la mitad en los primeros 14 días.

Experimentos más recientes como el de Marín-Briggiler y colaboradores en 2002 incubaron espermatozoides humanos capacitados durante 18 horas a 20 y 37 °C donde evaluaron hiperactivación, fosforilación de la proteína tirosina y reacción acrosómica. Llegando a la conclusión de que el espermatozoide humano a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C) no se capacita, sin embargo este efecto de bloqueo no afecta a la reacción acrosómica cuando los espermatozoides son expuestos nuevamente a 37 °C.

Boryshpolets y colaboradores en 2015 realizaron un análisis sobre el comportamiento de los espermatozoides humanos expuestos a termotaxis; las muestras de espermatozoides humanos fueron sometidas a un cambio de temperatura rápido (31 a 37 °C en 40 segundos) y se les realizó un análisis

cuantitativo de los parámetros de movilidad y cambios en la dirección del flagelo; antes, durante, y después del cambio de temperatura. En sus resultados destacan que los espermatozoides tienen alta sensibilidad a los cambios de temperatura durante la capacitación (incubación durante 2 h).

Finalmente los autores indicaron que los cambios de temperatura podrían ser un nuevo parámetro para la determinación de la calidad del espermatozoide. Destacando que se requiere más investigación en espermatozoides humanos.

Todos estos estudios concluyen que la temperatura es un factor que influye sobre la movilidad y la reacción acrosómica. Sin embargo, el efecto de la incubación en los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente no ha sido totalmente descrito, y la mayoría de los experimentos han sido realizados en animales de experimentación y pocos con espermatozoides humanos.

II. JUSTIFICACIÓN

El fenómeno de fertilización, es un proceso de comunicación intercelular que requiere la activación de mecanismos morfológicos y fisiológicos en los gametos masculino y femenino, mediados por interacciones celulares y del microambiente.

Estos mecanismos están condicionados por distintos factores de su entorno como por ejemplo: secreciones del aparato reproductor femenino, plasma seminal, grado de acidez del medio y temperatura.

Estudios en animales han mostrado que la temperatura de incubación tiene un efecto modulador sobre la movilidad espermática y la reacción acrosómica. Los espermatozoides humanos que son normalmente incubados a 37 ó 38 °C durante los experimentos *in vitro* y sometidos con frecuencia a las variaciones de la temperatura ambiente del laboratorio durante el curso de su preparación, se desconoce el efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$, el pH_i en espermatozoides capacitados a temperatura ambiente.

Sin embargo, el efecto de la incubación a temperatura ambiente del laboratorio en la capacitación del espermatozoide humano no ha sido completamente descrito. Por lo que la comprensión de estos mecanismos que conducen a la fertilización es fundamental para hacer frente a las crecientes tasas de infertilidad masculina.

El presente trabajo aportará conocimiento sobre los cambios a nivel fisiológico relacionados con la capacitación a temperatura ambiente del gameto masculino.

III. HIPÓTESIS

Si los espermatozoides incubados *in vitro* a 37 °C realizan los procesos como la capacitación, movilidad hiperactivada y estos procesos son dependientes de la entrada de Ca^{2+} , pH_i , potencial de membrana, entonces si son incubados a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) se promoverán de manera eficiente la capacitación, la movilidad hiperactivada y la entrada de Ca^{2+} , pH_i , potencial de membrana y movilidad relacionados con la capacidad fertilizante.

IV. OBJETIVOS

General:

Estudiar el efecto de la temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) en la capacitación de los espermatozoides humanos.

Particulares:

- Determinar la concentración de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides incubados a temperatura ambiente del laboratorio contrastándola con los que fueron capacitados a 37 °C.

- Evaluar el potencial de membrana de los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente del laboratorio y compararlos con los incubados a 37 °C.
- Evaluar la alcalinidad del pH_i de los espermatozoides capacitados incubados a 37 °C y compararlo con los espermatozoides incubados a temperatura ambiente del laboratorio.
- Estudiar la movilidad que presentan los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente del laboratorio y a 37 °C para analizar si existen diferencias entre ambas temperaturas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material y medios

El medio para espermatozoides humanos (HSM) se preparó con: 117.5 mM NaCl, 8.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.3 mM NaH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, 0.3 mM piruvato sódico, 19 mM de lactato de sodio, 2 mM de glucosa, y 25 mM HEPES y se ajustó a pH 7.6 con NaOH.

Medio de capacitación: Se preparó igual que HSM pero con HEPES 15 mM, 25 mM NaHCO₃⁻ y 3 mg/ml de albúmina sérica bovina ajustado a pH 7.6 con NaOH.

Percoll 75% y 50%: Ambos gradientes fueron amortiguados a pH 7.4 con HEPES 10 mM y NaCl 150 mM.

5.2 Purificación de los espermatozoides

Las muestras de semen humano se obtuvieron de 11 donadores entre 22 y 30 años de edad, con tres días de abstinencia sexual. Los donadores firmaron una

carta de consentimiento sobre el uso experimental de su muestra, autorizada por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, que a su vez sigue los lineamientos de la convención de Helsinki sobre el correcto manejo de muestras provenientes de humanos.

Las características de selección se tomaron de acuerdo al protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se utilizaron las muestras con las siguientes características de normalidad: color de semen blanco opalescente, volumen de 2-6 ml, densidad espermática $\geq 20 \times 10^6$; movilidad $> 50\%$ (WHO, 2010). Ver anexo A. La muestra de semen se incubó por 40 minutos a 37°C para reducir su viscosidad.

Con el objetivo de obtener los espermatozoides vivos de la muestra, se realizó la separación de los espermatozoides del plasma seminal mediante gradientes de percoll. El semen se colocó sobre un gradiente de 1ml de percoll al 75% y 1ml de percoll al 50% y centrifugado a 3500 rpm durante 20 minutos en tubos cónicos de 15 ml (Linares-Hernández *et al.*, 1988). La pastilla de espermatozoides se separó y se lavó con medio HSM mediante centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos. Después de haber obtenido la pastilla se realizaron las determinaciones de calcio intracelular, potencial de membrana, pH_i , y movilidad espermática.

5.3 Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con Fura-ff AM

Posterior a la última centrifugación de las muestras de semen ($0.6\text{--}1.5 \times 10^8$ células) se resuspendieron en 1 ml de medio HSM y se cargaron con $2 \mu\text{M}$ del derivado acetoximetil éster de Fura-ff AM, durante 40 minutos a 37°C . Este derivado es permeable a las células y en este tiempo de incubación se incorpora al citoplasma, ahí las esterasas separan al acetoximetilo, haciendo al colorante sensible al calcio. Después de los 40 minutos, se lavaron las células durante 5 minutos por centrifugación a 3500 rpm con 5 ml de medio HSM, esto con la finalidad de eliminar el Fura-ff AM no incorporado a la célula. Finalmente los

espermatozoides se subdividieron e incubaron a una temperatura de 25–28 °C y a 37 °C a los que se les adicionó HSM y/o HSM para capacitación, posteriormente se realizaron las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados y no capacitados a 0, 2 y 4 h (Figura 4).

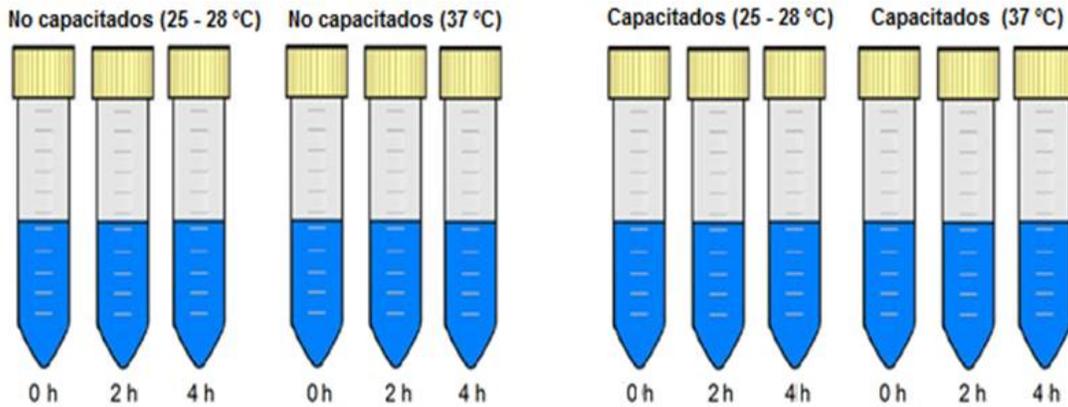


Figura 4. Incubación de los espermatozoides humanos. Se muestran los espermatozoides no capacitados y capacitados a (25-28 °C) y a 37 °C a los cuales se les realizó mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana, pH_i y movilidad espermática durante 0, 2 y 4 h.

5.3.1 Calibración de la $[Ca^{2+}]_i$

Los registros de Ca^{2+} se calibraron con la ecuación descrita por Grynkiewicz *et al.*, (1985) (Figura 5):

Con una $K_d = 5.5 \mu M$ como se describe en Neri *et al.*,(2006).

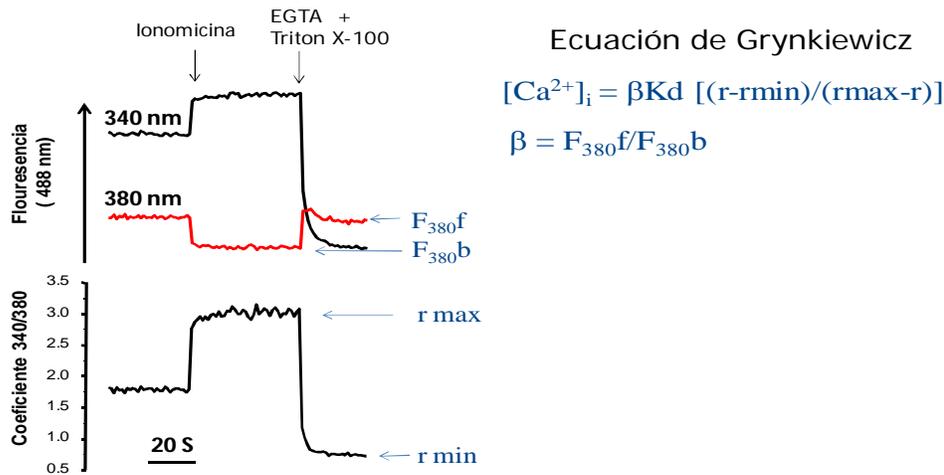


Figura 5. Calibración de la señal de calcio. Después de terminar cada uno de los experimentos se calibró como se muestra en la figura.

5.4 Determinación del potencial de membrana

La pastilla de espermatozoides que se obtuvo al eliminar el plasma seminal (1×10^7 espermatozoides) se subdividió y se les adicionó medio HSM y/o HSM para capacitación incubándolos a temperatura ambiente del laboratorio (25–28 °C) y a 37 °C. En cada una de las mediciones de potencial de membrana se añadió inmediatamente a la celda 2.5 ml de HSM + 0.5 μ M de diSC₃(5), previamente calentada a 25-28 °C o a 37 °C bajo agitación magnética constante y se realizaron las mediciones correspondientes con los espermatozoides capacitados y no capacitados a temperatura ambiente del laboratorio 25–28 °C y a 37 °C en el fluorómetro PTI (Tecnología de Fotón Internacional) a 0, 2 y 4 h como se muestra en la Figura 4.

El fluorómetro en donde se realizaron las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana y pH_i tiene dos fotomultiplicadores colocados a 90° con respecto a la fuente de la lámpara de Xenón (Figura 6). Un fotomultiplicador detecta la señal de Fura-ff AM, con un filtro de 488 nm (Andover), excitando a 340/380 con el monocromador de excitación del sistema PTI. El otro fotomultiplicador detecta la fluorescencia del diSC₃(5) a 670 nm, excitado a 600 nm con una lámpara de helio colocada adelante de la fuente de xenón. Tanto las longitudes de onda de excitación como emisión para diSC₃(5) se lograrán con filtros ópticos de interferencia (Andover). En las determinaciones de pH_i los fotomultiplicadores detectan la señal de la sonda fluorescente BCECF-AM, con un filtro de 550 nm (Andover), excitando a 500/440 con el monocromador del sistema PTI. Los datos adquiridos se digitalizaron a 0.83 Hz con la interfase PTI.

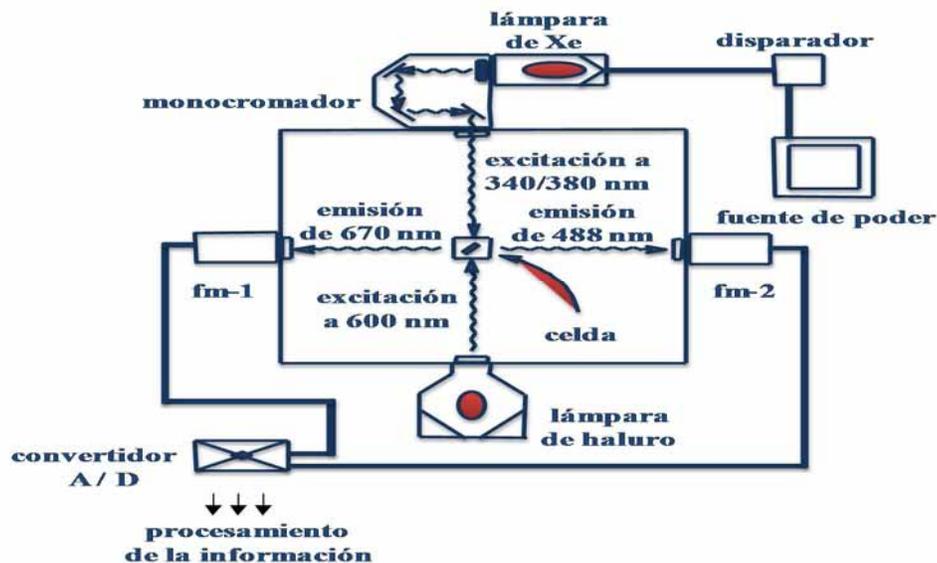


Figura 6. Representación esquemática del sistema óptico para las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$ y de potencial de membrana. Se ilustra la posición del monocromador con respecto a la celda y a la fuente de xenón. La lámpara adicional se encuentra en la ventana de excitación del monocromador y en ángulo recto a los filtros de emisión. El sistema de agitación se adaptó en la parte inferior de la celda, la cual cuenta con un termoestabilizador incluido en el equipo (Espectrofluórometro PTI) (Tomado de Torres Flores, 2011).

5.4.1 Calibración del potencial de membrana

La fluorescencia se calibró como previamente se reportó en Linares y colaboradores 1988, con algunas modificaciones. Al final de cada trazo se añadió 1.5 mM de valinomicina; un ionóforo selectivo a potasio (Figura 7), que se agregó para fijar el potencial de membrana al potencial de equilibrio de potasio (E_k), calculado con la ecuación de Nernst ($E_k = -61.54 \text{ mV} \log [K]_{in}/[K]_{ext}$). Teniendo en cuenta que la concentración del potasio intracelular ($[K]_i$) en el espermatozoide humano es de 120 mM (Linares-Hernández *et al.*, 1988). A una temperatura de 37 °C, la E_k para las poblaciones de espermatozoides humanos en HSM (K_{ext} 8.6 mM) es de -71 mV (González-Martínez, 2003). Un minuto después de la valinomicina se despolarizó con adiciones consecutivas de 15, 15, y 30 mM KCl con 30 segundos entre cada una, a valores de -43 -30 y -15 mV, respectivamente (Figura 7). Esta despolarización simultáneamente aumentó la fluorescencia de diSC₃(5). Con una relación lineal entre la fracción del cambio de la fluorescencia del diSC₃(5) ($F = F - F_0 / F_0$, donde F_0 es el valor de la fluorescencia obtenido

sobre la adición de valinomicina y F es el valor verdadero de la fluorescencia) y el potencial de membrana (Waggoner, 1979) (0.018-0.025 de cambio fraccionario de fluorescencia por mV). Tomando en cuenta los parámetros de la calibración, los valores verdaderos de la fluorescencia se transformaron en los valores de potencial de membrana según la Ecuación:

$$V_m = (F/mF_0 - 1/m) - b/m$$

Donde m y b son los parámetros de la curva lineal de la calibración, es decir la pendiente y el valor del eje Y (el cambio fraccionario de la fluorescencia) en 0 mV, respectivamente. Estos parámetros se obtuvieron de los datos de la calibración utilizando el software Origin versión 6.0. Se realizó una curva de calibración para cada uno de los trazos utilizando los pasos de la calibración descrita arriba; la relación lineal se mantiene hasta +5 mV. El potencial mitocondrial no contribuye a la señal del diSC₃(5) en el espermatozoide de humano, ya que en la mayoría de las incubaciones con CCCP (0.4 mM) y cianuro (1 mM) no se afecta la fluorescencia (Guzmán-Grenfell *et al.*, 2000). Lo anterior es consecuente con el papel secundario de este organelo en la movilidad del espermatozoide humano (Makler *et al.*, 1992). Así, las medidas simultáneas de potencial de membrana se realizaron en ausencia de inhibidores mitocondriales o desacopladores.

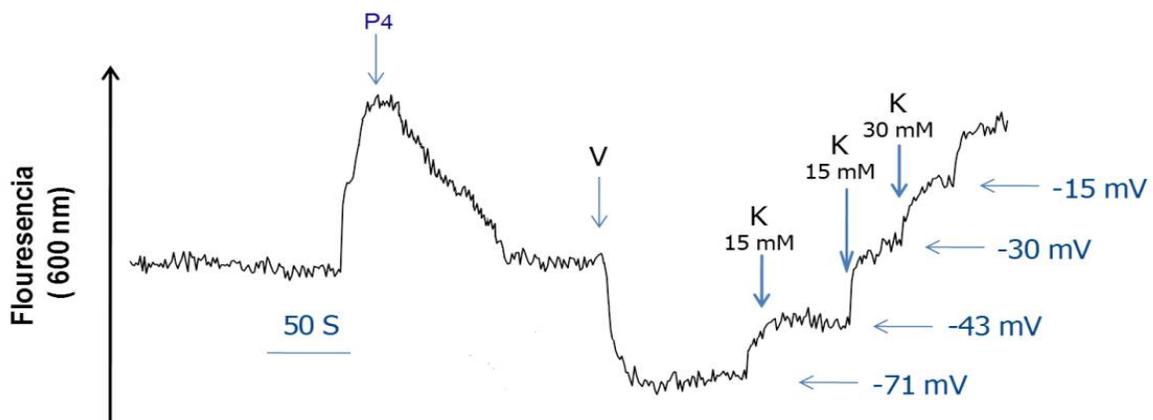


Figura 7. Calibración del potencial de membrana. Al final de cada trazo se añadió 1.5 μ M de valinomicina, se agregó para fijar el potencial de membrana al potencial de equilibrio de potasio (E_k). Teniendo en cuenta que la concentración del potasio intracelular ($[K]_i$) en el espermatozoide humano es de 120 mM a una temperatura 37 °C, la E_k para las poblaciones de espermatozoides humanos en HSM (K_{ext} 8.6 mM) es de -71 mV. Un minuto después de la valinomicina se despolarizó con adiciones consecutivas de 15, 15, y 30 mM KCl con 30 s entre cada una, a valores de -43 -30 y -15 mV, respectivamente.

5.5 Determinación de pH_i

Las células se cargaron con la sonda fluorescente BCECF-AM (1 μ M durante 30 minutos). Las células cargadas y divididas (Figura 5), se centrifugaron y fueron añadidas a la celda de fluorescencia. La fluorescencia se detectó a 550 nm, excitando alternadamente a 500 nm y a 440 nm (longitudes de onda insensibles al pH).

Para calibrar la señal, se permeabilizaron las células con 0.1% Tritón X-100. Esta permeabilización deberá aumentar el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH del medio HSM, esto es pH 7.6 (Figura 8a y 8b).

Posteriormente, se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de HCl al 0.3 % (10 μ L) (Figuras 8a y 8b) y se comparó los valores de R con los pH medidos con un electrodo normal de pH en cada administración (Figura 8c), consistentemente los valores de R en función del pH muestran una curva sigmoide. Los datos obtenidos se analizaron con el software del PTI para convertir los valores de R a valores de pH_i (Figura 8d).

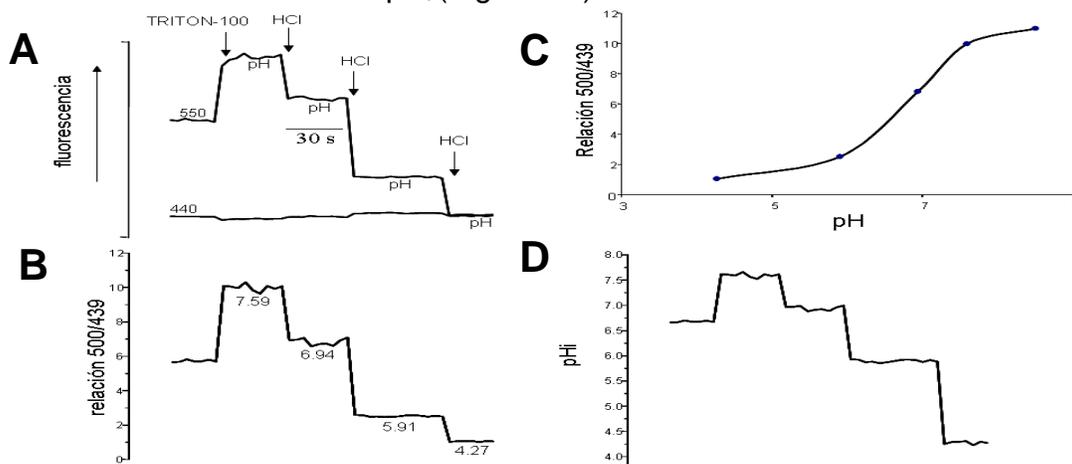


Figura 8. Calibración de la señal de pH_i . **A-B.** Se permeabilizaron las células con 0.1 % Tritón X-100. Esta permeabilización aumentó el valor de R (fluorescencia a 550 nm y su excitación a 500 nm dividida entre 440 nm: 500/440) a un valor correspondiente al pH del medio HSM, esto es pH 7.6, posteriormente se acidificó a tres valores diferentes mediante adiciones de HCl (10 μ L) al 0.3%. **C.** Se compararon los valores de R con los pH medidos con un electrodo normal de pH en cada administración, consistentemente los valores de R en función del pH muestra una curva sigmoide. **D.** Los datos obtenidos se analizaron con el software del PTI para convertir los valores de R a valores de pH_i (Tomado de Neri, 2007).

5.6 Ensayos de movilidad

Existen diversos métodos cuantitativos y cualitativos sobre el estudio y análisis de la movilidad espermática. En estos métodos se evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presenta la media de una población espermática. Estas medidas ofrecen una descripción general de la movilidad espermática, pero la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida utilizado y por la destreza del observador.

Sin embargo, la creación de los sistemas informatizados de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la movilidad de los espermatozoides. Estos sistemas, denominados CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), han automatizado y simplificado el proceso convirtiéndose en una valiosa herramienta en la evaluación de la calidad del semen (Verstegen *et al.*, 2002). Ya que permite tener una clasificación objetiva de los parámetros de movilidad de una población espermática utilizando imágenes digitales mediante valores determinados para cada espermatozoide considerando la velocidad del movimiento y la frecuencia del cambio en la dirección de la cabeza (Ostermeier *et al.*, 2001).

Con la finalidad de hacer una evaluación objetiva de la movilidad espermática se utilizó el sistema de análisis automatizado de movilidad espermática (CASA) de la marca Hamilton-Thorn. Después de pasarlos por el gradiente de percoll, la movilidad de los espermatozoides se determinó en función del tiempo. Se evaluaron 20 campos a 60 Hz en campo oscuro, capturándolos con un objetivo 20x a 25-28 °C y a 37 °C. En cada tratamiento se cuantificaron entre 2000-3000 espermatozoides. Se determinaron los parámetros cinéticos del espermatozoide durante su desplazamiento (Figura 9). Las definiciones de cada uno de estos parámetros se encuentran descritas en el anexo B.

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

VAP: Velocidad de la trayectoria media

LIN: Linealidad

STR: Rectitud de la trayectoria media

ALH: Amplitud de desplazamiento lateral

BCF: Frecuencia de batido

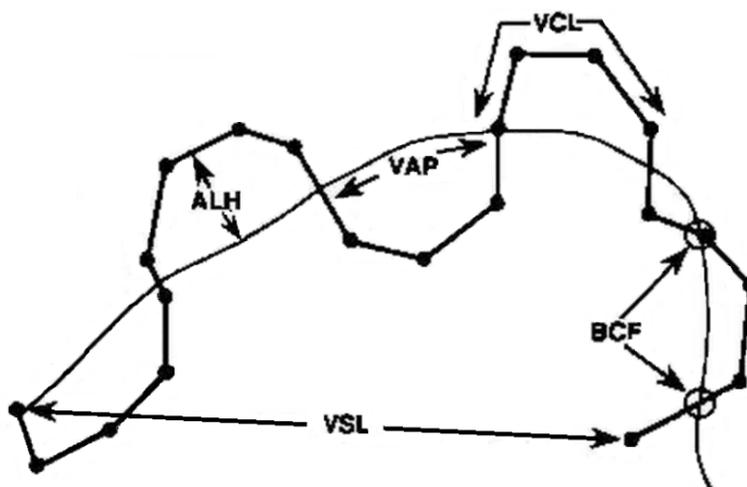


Figura 9. Representación esquemática de los parámetros cinéticos muestreados por el CASA. (Tomado de Owen y Katz, 1993).

El porcentaje de células hiperactivadas en este estudio fue evaluado mediante los criterios estándar para identificar la hiperactivación como lo establece Mortimer y Mortimer (1990), donde los espermatozoides presentan las siguientes medidas cinéticas: $VCL > 100$ micras/s, $LIN < 60\%$ y $ALH \geq 5$ micras.

Las medidas cinéticas de los espermatozoides en el sistema CASA están basadas en las sucesivas posiciones del centroide de la cabeza espermática a través del tiempo. La geometría de las trayectorias determina las velocidades y los patrones de movimiento (Mortimer *et al.*, 2000).

El sistema CASA realiza la digitalización de las imágenes espermáticas a partir de un campo microscópico, mediante la identificación de cabezas espermáticas en base a su tamaño, forma y luminosidad. Una vez identificadas, las posiciones sucesivas de las mismas permitirán el análisis de las trayectorias generadas. Los componentes comunes de los instrumentos CASA son una cámara de video, una computadora y un microscopio. Los programas informáticos que utiliza son para identificar y para seguir a todos los espermatozoides en las imágenes de video y para realizar los cálculos de los datos (Boyers *et al.*, 1989).

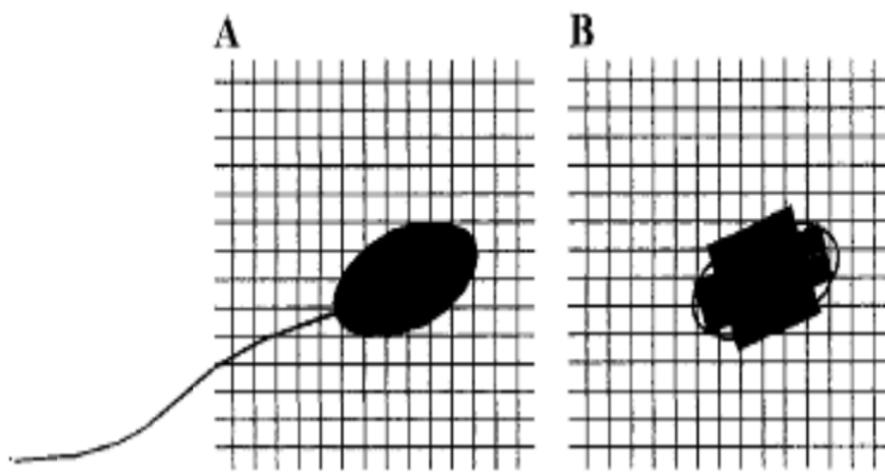


Figura 10. Digitalización de la imagen de la cabeza del espermatozoide. **A.** La imagen de un espermatozoide con elementos de la foto sobrepuestos (píxeles) que son usados para realizar el de la imagen de video **B.** Es como la computadora registra la cabeza del espermatozoide (Tomado de Mortimer 2000).

5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como medias \pm error estándar (ES). Se aplicó un análisis de T-Student, donde los valores con una probabilidad <0.05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis de los datos se realizó con el software SigmaPlot, versión 11.

VI. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de cada una de las mediciones realizadas a los espermatozoides humanos.

6.1 Efecto de la temperatura sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido con progesterona

A los espermatozoides capacitados a 37 °C y a temperatura ambiente del laboratorio se les agregó 4 μ M de progesterona un minuto después de haberlos colocado en la celda y bajo agitación magnética constante. Los trazos representativos de las determinaciones sobre la $[Ca^{2+}]_i$ se muestran en la Figura 11.

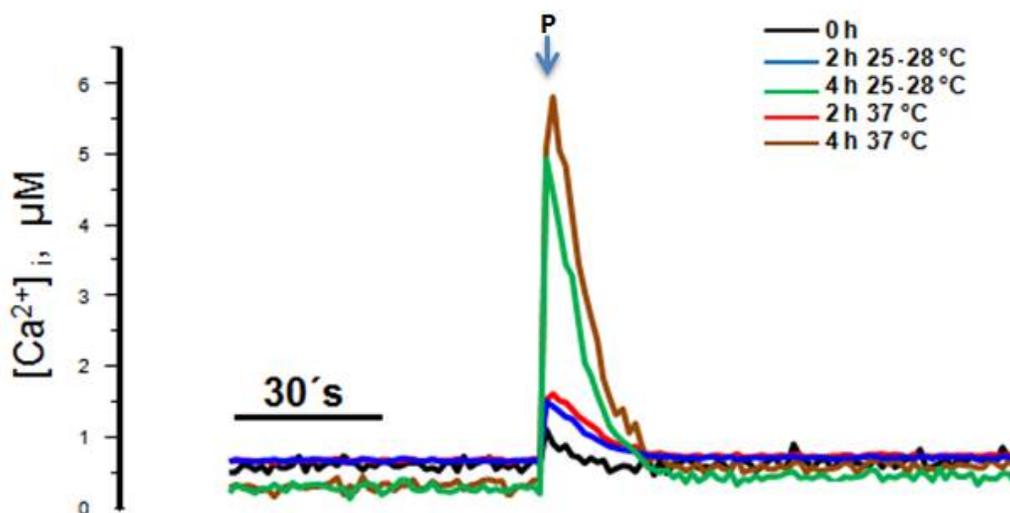


Figura 11. Efecto de la incubación (0, 2, 4 h) a diferente temperatura (25-28 °C y 37 °C) sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides no capacitados y capacitados inducido con 4 μ M de Progesterona. n=4

Las mediciones realizadas sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides incubados en un medio con la ausencia de bicarbonato y de albumina al adicionar progesterona

mostró niveles bajos en la $[Ca^{2+}]_i$ (testigo-trazo negro) alcanzando una concentración intracelular de 1.2 μM .

Por otra parte los espermatozoides capacitados a 37 °C en un periodo de 2 h tuvieron un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de 1.5 μM ; los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente del laboratorio durante 2 h tuvieron un incremento 1.6 μM .

En un periodo de 4 h de incubación los espermatozoides a una temperatura de 37°C (trazo café) al inducirlos con 4 μm de progesterona se observó una elevación rápida de la $[Ca^{2+}]_i$ de 4.69 μM ; que decae durante los siguientes 15 a 20 segundos disminuyendo su amplitud y cinética; mientras que los espermatozoides capacitados e incubados durante 4 h a temperatura ambiente del laboratorio 25-28 °C (trazo verde) cuando se les agregó progesterona tuvieron un incremento de 4.21 μM en la $[Ca^{2+}]_i$ y posteriormente fue disminuyendo en los siguientes 15 a 20 segundos.

Tanto los espermatozoides incubados durante 2 y 4 h a 37 °C y a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) mostraron diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 12), los resultados obtenidos sobre los espermatozoides incubados en medio HSM de capacitación en un lapso de 0 h en la $[Ca^{2+}]_i$ fue de 0.59 ± 0.19 , los espermatozoides capacitados a 37 °C durante 2 h tuvieron un incremento de 2.34 ± 0.75 , en un periodo de 4 h de incubación a temperatura ambiente del laboratorio fue de 4.21 ± 0.40 ; mientras que a una incubación a una temperatura de 37 °C en un periodo de 2 h la $[Ca^{2+}]_i$ fue de 2.58 ± 3.51 , con una incubación de 4 h a 37 °C la $[Ca^{2+}]_i$ fue de 4.69 ± 0.49 . Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre los espermatozoides incubados a 37 °C y a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C); aunque si se observó diferencia significativa dentro de cada tratamiento (Figura 12).

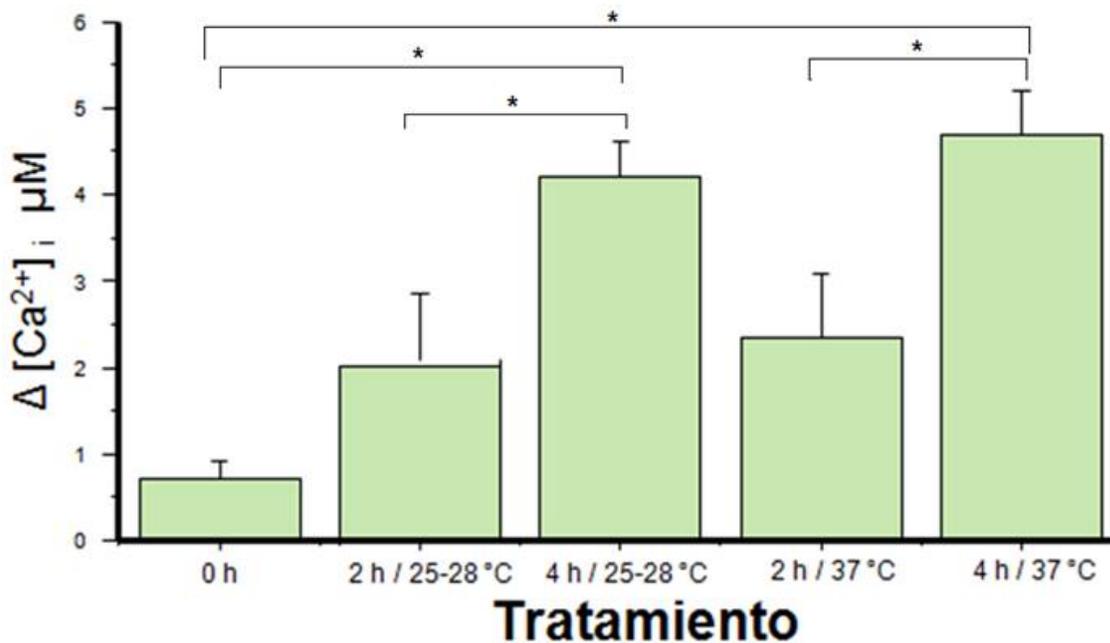


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos capacitados. ($\Delta = [Ca^{2+}]_i$ en el pico menos la $[Ca^{2+}]_i$ basal. El dato del Ca^{2+} basal se tomó justo antes de la estimulación con la Progesterona) expresado con la media \pm ES de una $n = 4$. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos en comparación con su correspondiente testigo.

6.2 Efecto de la temperatura sobre el potencial de membrana de los espermatozoides humanos capacitados.

La figura 13 muestra las mediciones realizadas del potencial de membrana (pM) en los espermatozoides incubados a diferentes temperaturas. Al adicionar 4 μ M de progesterona en espermatozoides no capacitados (testigo-trazo negro) se observó una despolarización transitoria seguida de una hiperpolarización de la membrana (-50 ± 1.74); por otra parte los espermatozoides incubados durante 2 h a 37 °C (trazo azul) cuando se le agrego progesterona ocurrió una hiperpolarización de la membrana (-49.00 ± 1.6), en cambio a temperatura ambiente del laboratorio con una incubación de 2 h (trazo rojo) ocurrió una despolarización en la membrana de los espermatozoides (-50.07 ± 1.48).

Mientras que a los espermatozoides capacitados a 37 °C durante 4 h (trazo verde) después de inducirlos con 4 μ M de progesterona se observó una hiperpolarización

del pM llegando a -50 ± 1.21 mV, y en los espermatozoides capacitados e incubados a temperatura ambiente del laboratorio 25-28 °C (trazo café) cuando se les agregó progesterona la hiperpolarización del pM llegó a -49.25 ± 2.23 mV (Figura 13 B). No se observó diferencia significativa en ningún tratamiento antes de la adición de progesterona (Figura 13 A).

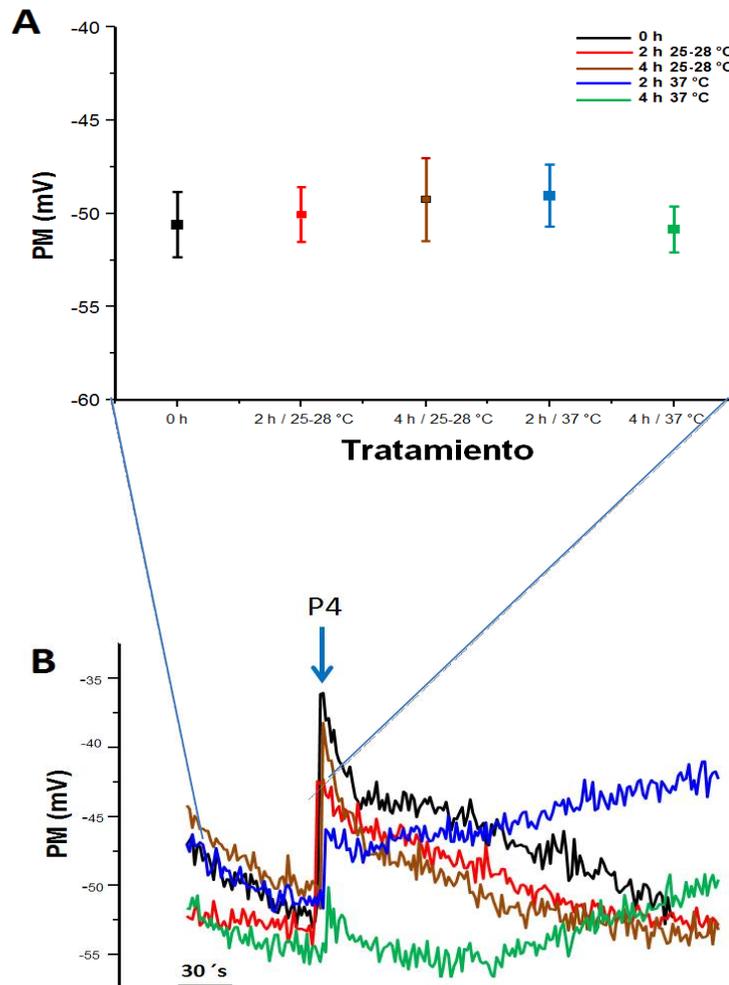


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre el potencial de membrana en espermatozoides capacitados y no capacitados en un periodo de 0, 2 y 4 h. **A.** Media \pm ES de una $n=7$ individuos del potencial de membrana en espermatozoides incubados a 0, 2 y 4 h. Este dato fue tomado antes de la adición de progesterona. **B.** Trazos que representan el efecto de la temperatura (37 °C y 25-28 °C) sobre el potencial de membrana en espermatozoides de humano.

6.3 Efecto de la temperatura sobre el pH_i en espermatozoides humanos capacitados.

Los cambios de pH_i son muy importantes en la fisiología de todas las células ya que modulan múltiples enzimas y canales iónicos, y el espermatozoide no es la excepción. Por lo anterior, se nos hizo importante medir el pH_i en los espermatozoides y determinar si con la incubación a diferentes temperaturas (25-28 °C y 37 °C) y a diferentes tiempos (0, 2 y 4 h) se observaba un cambio en el pH_i , así como, descartar que la progesterona tiene un efecto sobre el pH_i , por sí mismo, y que el efecto que se observa en el incremento del calcio se debiera a este cambio. La figura 14 muestra los trazos representativos del pH_i , donde se puede apreciar el pH_i basal de los espermatozoides capacitados antes y después de la adición de la progesterona incubados a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) y a 37 °C en un lapso de 0, 2, y 4 h.

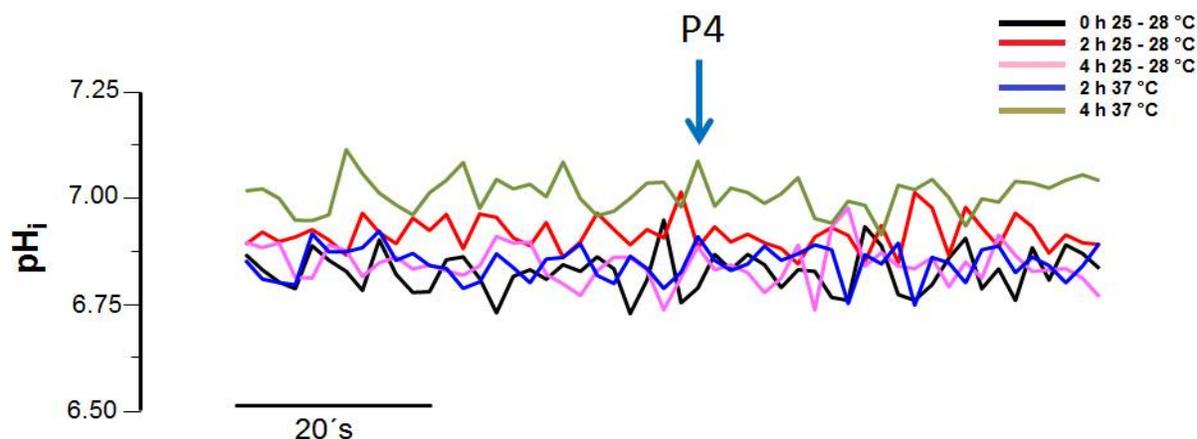


Figura 14. Efecto de la incubación de 0, 2, y 4 h a diferente temperatura (25-28 °C y 37 °C) sobre el pH_i en espermatozoides capacitados y estimulados con 4 μM de progesterona. Trazos representativos de una $n=5$. La incubación de los espermatozoides en diferentes temperaturas muestra pH_i basal, aunque no presenta diferencia significativa.

En estas mediciones los espermatozoides testigo (0 h) a una temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) tuvieron un pH_i de 6.82 ± 0.013 , los espermatozoides capacitados a 37 °C durante 2 h tuvieron un pH_i de 6.85 ± 0.01 , mientras que los espermatozoides capacitados e incubados a temperatura

ambiente 25-28 °C en un tiempo de incubación de 2 h fue de 6.82 ± 0.02 . Las poblaciones de espermatozoides con un tratamiento de 4 h a una temperatura de 37 °C tuvieron un pH_i de 6.92 ± 0.04 , a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) en pH_i de los espermatozoides capacitados fue de 6.85 ± 0.03 . En estas condiciones no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, así mismo, tampoco la adición de 4 μM de progesterona causó un cambio en el pH_i en los espermatozoides humanos capacitados (Figura 15).

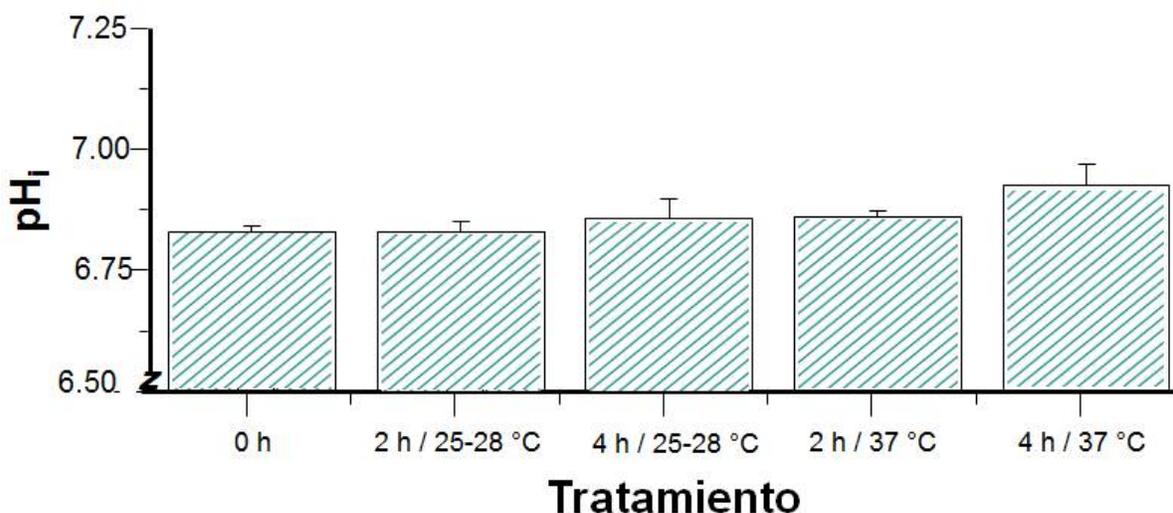


Figura 15. pH_i en espermatozoides capacitados a temperatura ambiente y a 37 °C en un periodo de incubación de 0, 2, y 4 h. Media \pm ES de una $n=5$ del pH_i . No se mostraron diferencias significativas entre ningún tratamiento.

6.4 Efecto de la temperatura sobre la movilidad de los espermatozoides humanos.

Los resultados que se obtuvieron en los experimentos realizados con el sistema computarizado CASA se muestran a continuación; cada una de las gráficas simboliza las mediciones en los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente del laboratorio (25 – 28 °C) y a 37 °C durante un lapso de 0, 2 y 4 h.

El promedio de la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides en el testigo (0 h) en este experimento fue de $98.57 \pm 5.65 \mu\text{m/s}$. Los espermatozoides incubados en un medio HSM de capacitación a temperatura ambiente del

laboratorio (25 - 28 °C) en un periodo de 2 h fue de $104.8 \pm 6.35 \mu\text{m/s}$, por otra parte los espermatozoides incubados durante 4 h a temperatura ambiente presentaron una movilidad de $85.6 \pm 4.20 \mu\text{m/s}$. Los espermatozoides incubados a una temperatura de 37 °C presentaron una movilidad ligeramente superior que a temperatura ambiente del laboratorio en un periodo de incubación de 2 h con un promedio de $105.32 \pm 2.86 \mu\text{m/s}$ y en un tiempo de incubación de 4 h a una temperatura de 37 °C la velocidad curvilínea en los espermatozoides capacitados fue de $103.9 \pm 3.34 \mu\text{m/s}$, estos valores se encuentran representados en la Figura 16.

Donde se puede observar que en un periodo de incubación de 2 h a temperatura ambiente tuvo diferencias significativas con el grupo de espermatozoides incubados durante 4 h a 28 °C, por otra parte a 2 h a una temperatura de 37 °C con 4 h a temperatura ambiente, finalmente los incubados a temperatura ambiente de 4 h tuvieron diferencia estadística con los incubados a 37 °C

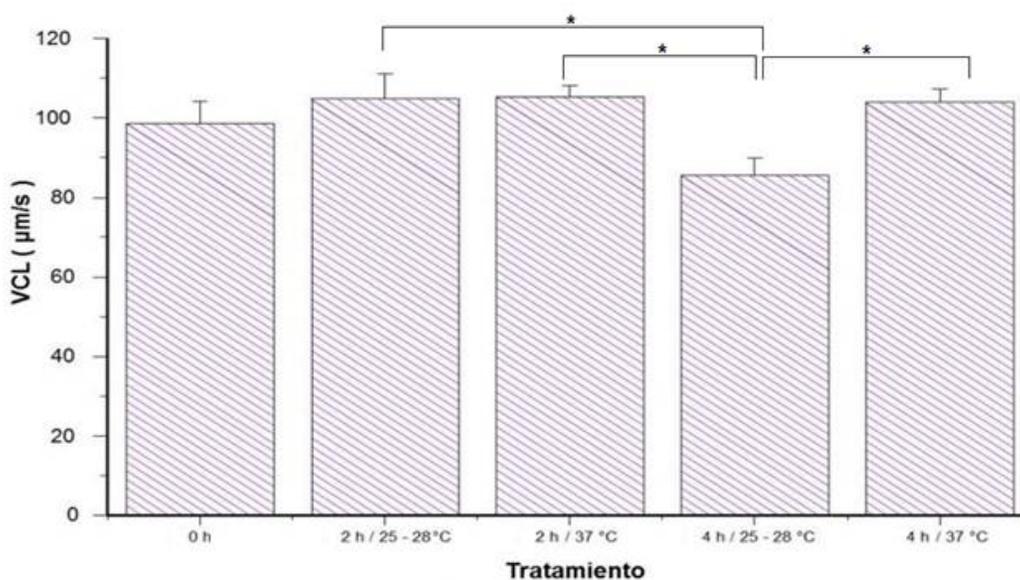


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la velocidad curvilínea de los espermatozoides capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. Los espermatozoides incubados a 0 h (testigo) se encuentran en la primera barra de la gráfica, la segunda y tercera barra representan la incubación de espermatozoides durante 2 h a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C respectivamente, cuarta y quinta barra representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C durante una incubación de 4 h. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P<0.05$) entre los diferentes tratamientos.

Al evaluar la velocidad rectilínea (VSL) en los espermatozoides humanos incubados durante 0 h (testigo) se obtuvo un promedio de $57.65 \pm 7.25 \mu\text{m/s}$; en un medio adicionado con albumina y bicarbonato (HSM capacitación) con un tiempo de incubación de 2 y 4 h a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) el promedio fue de $44.92 \pm 1.76 \mu\text{m/s}$ y de $36.52 \pm 1.72 \mu\text{m/s}$ respectivamente. En los espermatozoides capacitados a una temperatura de 37 °C se obtuvo una velocidad rectilínea en los espermatozoides de $52.5 \pm 5.07 \mu\text{m/s}$ a las 2 h y finalmente en las mediciones realizadas a 4 h en los espermatozoides el promedio fue de $54.8 \pm 5.43 \mu\text{m/s}$ (Figura 17).

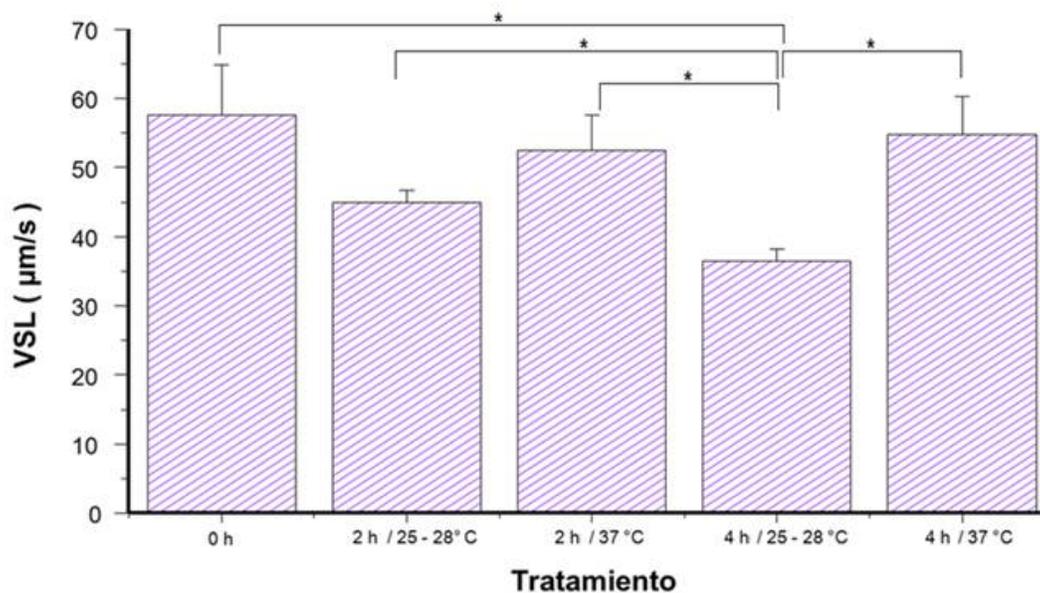


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la velocidad rectilínea en los espermatozoides capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. La primera barra representa a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), las siguientes dos barras representan la incubación de espermatozoides durante 2 h a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C respectivamente, los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C durante 4 h se representan en las 2 últimas barras de la gráfica. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P<0.05$) entre los diferentes tratamientos.

La figura 18 representa los resultados obtenidos del promedio de la velocidad de la trayectoria media (VAP). En los espermatozoides humanos incubados a 0 h (testigo) la trayectoria media fue de $61.72 \pm 6.63 \mu\text{m/s}$. A temperatura ambiente

(25-28 °C) con una incubación de 2 h la media fue de $57.75 \pm 2.02 \mu\text{m/s}$, posteriormente a las 4 h a temperatura ambiente el promedio fue de $47.67 \pm 2.00 \mu\text{m/s}$, mientras que a 37 °C hubo un incremento de la velocidad a 2 h al compararlo con los espermatozoides incubados a temperatura ambiente con un valor de $62.57 \pm 4.07 \mu\text{m/s}$, a 4 h también hubo un ligero aumento al compararlos con los de temperatura ambiente con los de 37 °C con un promedio de $63.1 \pm 4.20 \mu\text{m/s}$. Observándose diferencia significativa entre 2 y 4 h incubados a 37 °C.

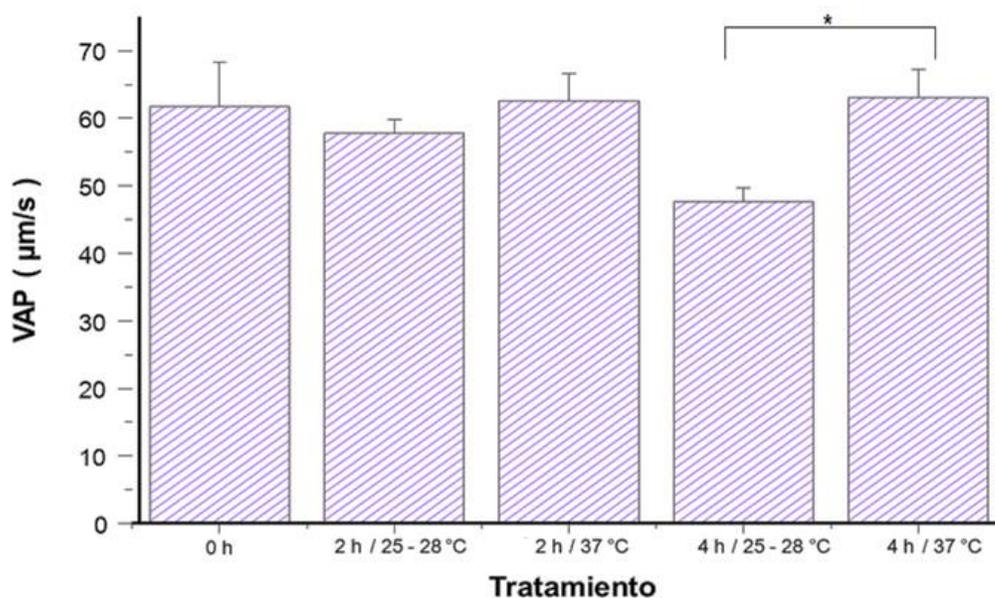


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la trayectoria media en espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de n=4. En la primera barras de la gráfica se muestran los promedios de los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), seguidos de los espermatozoides incubados durante 2 h a temperatura ambiente 25–28 °C, la siguiente barra representa incubación a 37 °C durante 2 h, finalmente las últimas dos barras se encuentra el promedio de la incubación a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C durante 4 h. El asterisco (*) muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los espermatozoides incubados 2 o 4 h a 37 °C.

La linealidad (LIN) de los espermatozoides incubados en este experimento se encuentra en la Figura 20, en la cual se puede observar que en el testigo (0 h) el promedio fue de $58.5 \pm 3.96 \%$, a 2 h los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente tuvieron una linealidad de 43.75 ± 3.35 por otra parte en los

espermatozoides incubados a 37 °C durante 2 h la linealidad fue de 48.5 ± 4.73 %. A las 4 h de incubación el valor fue mayor en los espermatozoides capacitados a una temperatura de 37 °C con un valor de 50.25 ± 4.87 %, los espermatozoides a una temperatura ambiente incubados a 4 h tuvieron una linealidad de 42.25 ± 2.59 % este valor fue menor que en los espermatozoides incubados a 37 °C. La linealidad de los espermatozoides incubados durante 0 h presentaron diferencia estadística con los incubados a 2 y 4 h a 25-28 °C.

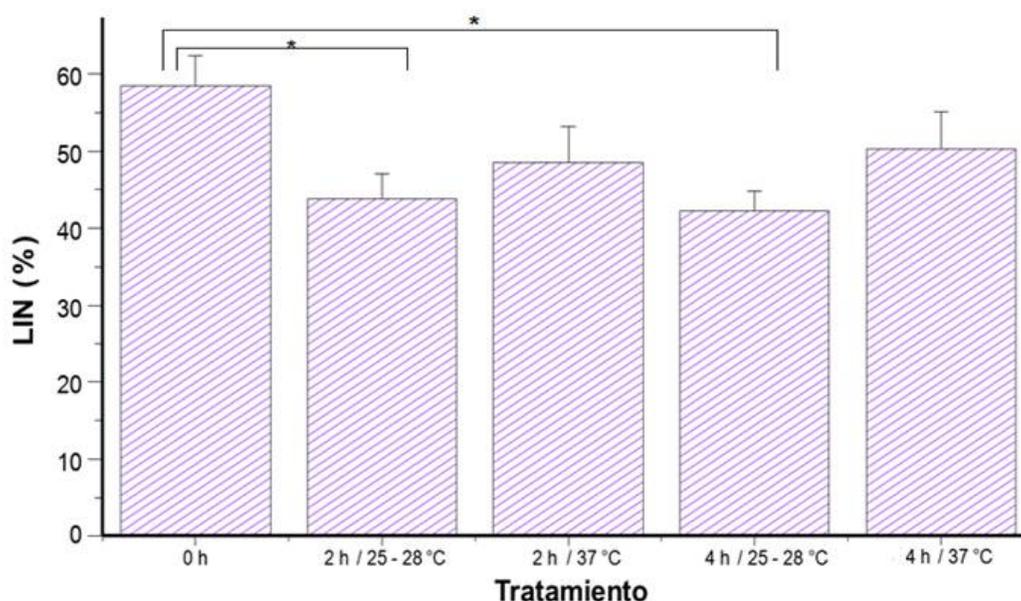


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la linealidad en espermatozoides capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. Los espermatozoides incubados a 0 h (testigo) se muestran en la primera barra, la segunda y tercera barra representan la incubación de espermatozoides durante 2 h a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C respectivamente, los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25–28 °C y a 37 °C durante 4 h son representados en las dos últimas barras. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P<0.05$) entre el testigo y los espermatozoides incubados a temperatura ambiente.

El promedio de los valores sobre la rectitud de la trayectoria media (STR) en los espermatozoides están representados en la figura 21 en un periodo de 0 h (testigo) se obtuvo un promedio de 84.5 ± 3.1 %, las mediciones realizadas en un periodo de 2 h a temperatura ambiente del laboratorio (25–28 °C) fue de 75.75 ± 2.49 %, a una temperatura de 37 °C el promedio realizado en las mediciones de 2 h fue de 79 ± 3.58 %. Posteriormente en los espermatozoides incubados durante 4

h a temperatura ambiente el promedio fue $72.25 \pm 1.93 \%$, mientras que en los espermatozoides capacitados a 37°C a 4 h después de su incubación se obtuvo un promedio de $80.75 \pm 3.94 \%$. Presentando diferencia estadística en los espermatozoides incubados a 0 h con los incubados a 4 h a temperatura ambiente (Figura 20).

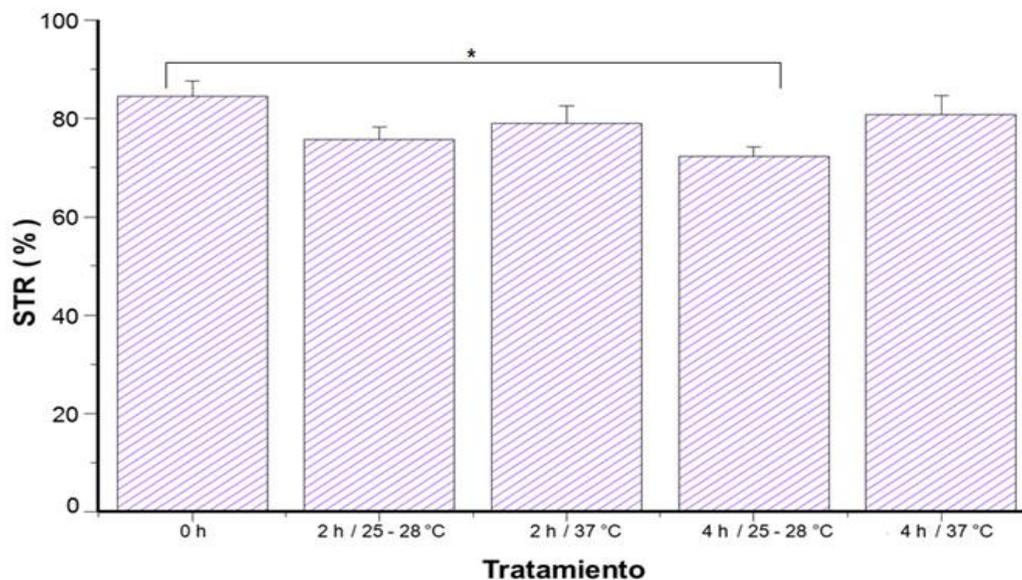


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la rectitud de la trayectoria media en espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. El promedio de la incubación a 0 h (testigo) se encuentra en la primera barra, la segunda y tercera representan la incubación durante 2 h a temperatura ambiente $25\text{--}28^\circ\text{C}$ y a 37°C respectivamente, la incubación en un lapso de 4 h a temperatura ambiente $25\text{--}28^\circ\text{C}$ y 37°C se encuentra representada en las 2 últimas barras de la gráfica. El asterisco (*) muestra diferencia significativa ($P<0.05$) entre los espermatozoides incubados 4 h a temperatura ambiente con el testigo.

El promedio de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) con respecto al testigo (0 h) fue de $4.07 \pm 0.28 \mu\text{m}$, a 37°C con una incubación en un lapso de 2 h fue de $4.9 \pm 0.20 \mu\text{m}$, por otra parte a temperatura ambiente con una incubación de 2 h el promedio fue de $4.6 \pm 0.41 \mu\text{m}$, finalmente a 4 h a una temperatura de 37°C el promedio de los resultados obtenidos fue de $4.85 \pm 0.27 \mu\text{m}$ mientras que a temperatura ambiente se redujo ligeramente el promedio sobre la amplitud de desplazamiento lateral de los

espermatozoides humanos incubados con un valor de $4.65 \pm 0.32 \mu\text{m}$ como se muestra en la figura 21. No se observaron diferencias significativas.

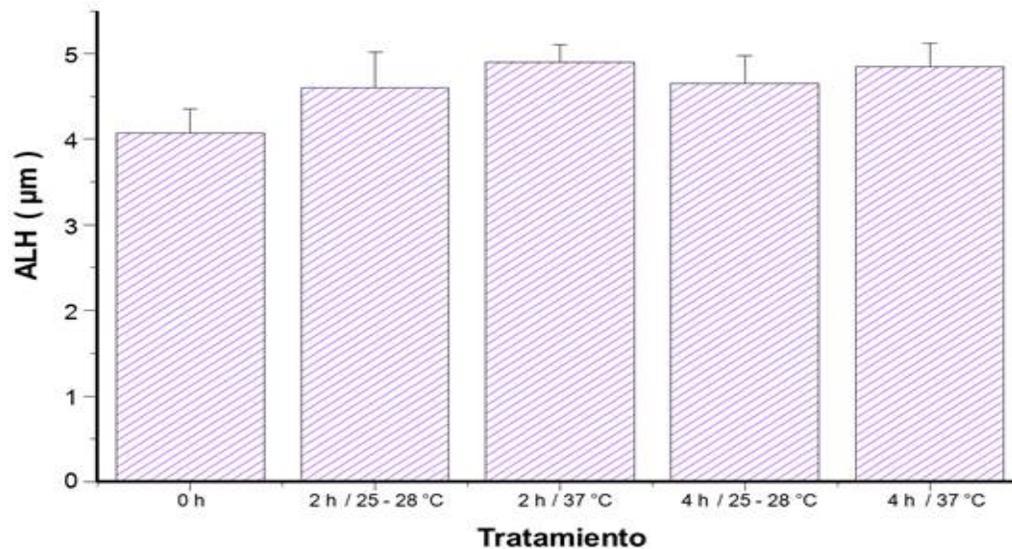


Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. La primera barra en la gráfica simboliza a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), la incubación en un lapso de 2 h en espermatozoides humanos incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C se representa en la segunda y tercera barra, los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C durante 4 h se muestran en las dos últimas barras de la gráfica.

El efecto de la temperatura sobre la frecuencia de batido flagelar de los espermatozoides humanos (BCF) se encuentra representada en la figura 22; la cual muestra que el testigo (0 h) en este experimento fue de 26.7 ± 1.97 Hz. Por otra parte a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) los espermatozoides humanos en un lapso de incubación de 2 h la frecuencia de batido flagelar fue de 22.12 ± 0.52 Hz, posteriormente a las 4 h el promedio aumento ligeramente con un valor de 22.52 ± 0.68 Hz. Finalmente a 37 °C la frecuencia de batido flagelar fue de 26.97 ± 0.96 Hz a las 2 h, mientras que a las 4 h con la misma temperatura el promedio poblacional fue de 29.27 ± 0.31 Hz.

Estos cambios mostraron diferencia significativa sobre el batido flagelar de los espermatozoides incubados a 2 h a temperatura ambiente con los incubados a 37°C por el mismo tiempo. Así mismo, la incubación de 2 h a 37 °C y a 4h a temperatura ambiente presenta diferencia significativa. Con un tiempo de incubación durante 2 h a temperatura ambiente tuvieron diferencia significativa con los incubados a 37 °C durante 4 h. Los espermatozoides incubados durante 4 h a temperatura ambiente tuvieron diferencia significativa con los incubados en ese mismo tiempo a 37 °C.

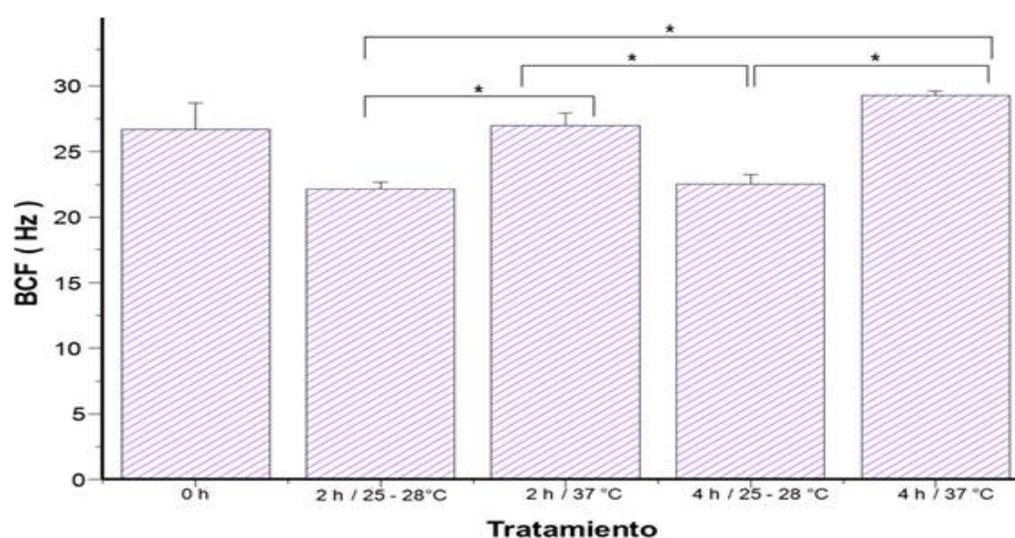
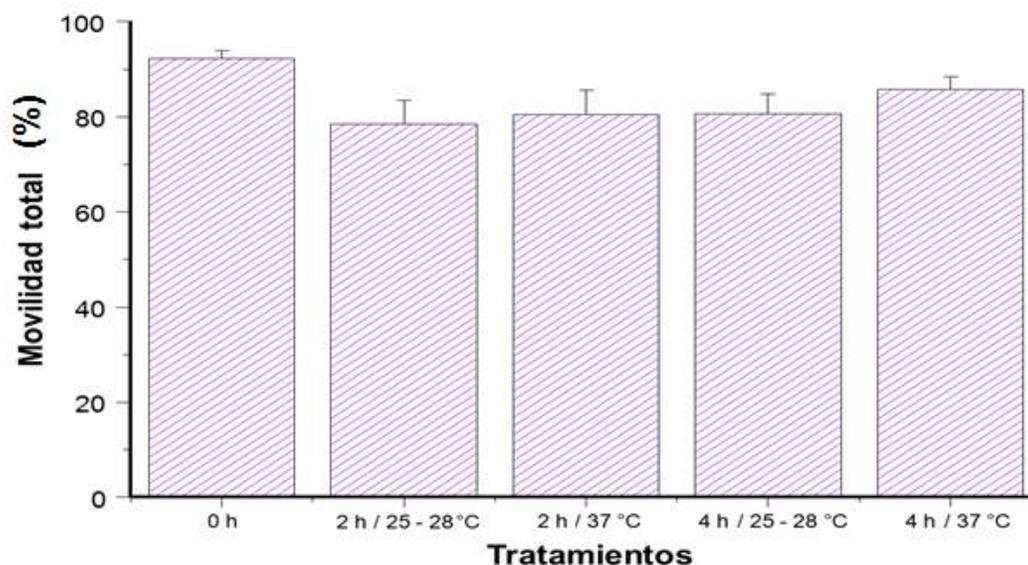


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de batido flagelar en espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. La primera barra representa a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), la segunda y tercera barra representan la incubación de espermatozoides durante 2 h a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C respectivamente, cuarta y quinta barra representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C durante 4 h. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P<0.05$) entre los diferentes tratamientos.

En la figura 23 se encuentra esquematizado el efecto de la temperatura sobre la movilidad total de los espermatozoides humanos, la primera barra de la gráfica representa el testigo del experimento (0 h) el promedio fue de 92.25 ± 1.65 . Por otra parte los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente durante 2 h se obtuvo un promedio de 78.5 ± 4.97 . Las mediciones realizadas a una temperatura de 37 °C durante una incubación de 2 h se obtuvo un promedio de 80.5 ± 5.13 y un promedio de 80.75 ± 4.04 en espermatozoides capacitados a

temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) durante un periodo de incubación de 4 h y a una temperatura de 37 °C con 85.75 ± 2.71 a 4 h de incubación. Como podemos observar no hubo diferencia significativa entre ningún tratamiento.

Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la movilidad total de espermatozoides capacitados humanos. La gráfica representa la medias \pm ES de una de n=4. Los espermatozoides incubados a 0 h (testigo) se encuentran en la primera barra, la segunda y tercera barra muestran la incubación de espermatozoides



durante 2 h a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C respectivamente, cuarta y quinta barra representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C en un lapso de 4 h.

El movimiento progresivo de los espermatozoides humanos en este experimento mostro un promedio de 69.75 ± 4.40 en el testigo (0 h). Posteriormente con un tratamiento de 2 h a temperatura ambiente el promedio fue de 39 ± 7.54 , el promedio de la incubación en los espermatozoides humanos progresivos durante 4 h a temperatura ambiente fue de 35.75 ± 4.09 . A 37° C durante 2 h de incubación fue de 49 ± 8.21 y finalmente la incubación de los espermatozoides a una temperatura de 37 °C en un periodo de 4 h fue de 54.25 ± 8.03 espermatozoides progresivos (Figura 24).

El movimiento progresivo de los espermatozoides con una incubación de 0 h y de 2 h a temperatura ambiente tuvieron diferencia significativa. Los espermatozoides incubados en un periodo de 0 h y los que fueron incubados durante 4 h a temperatura ambiente tuvieron diferencia significativa en el movimiento progresivo (Figura 24).

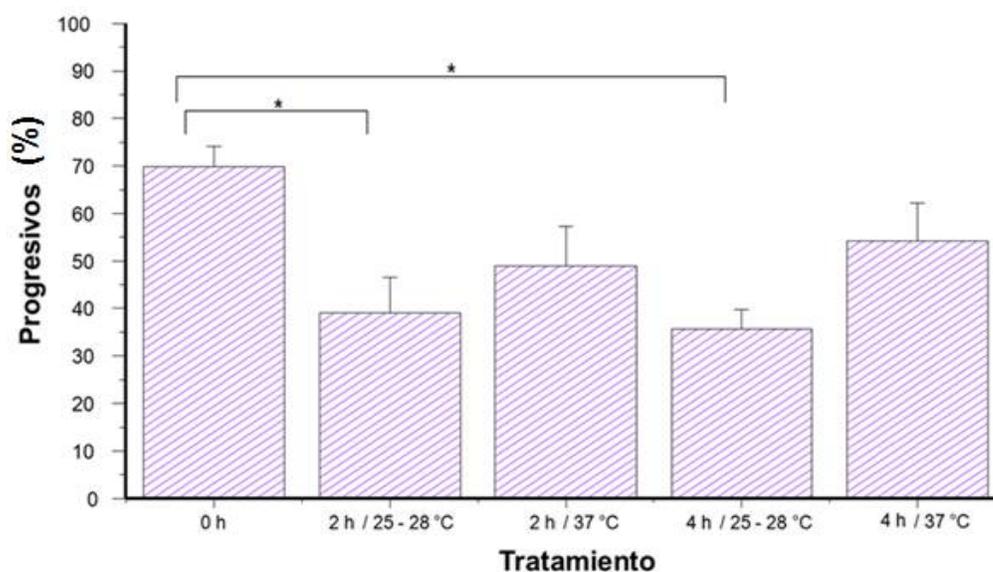


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre el movimiento progresivo en espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. La primera barra representa a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), la incubación de espermatozoides durante 2 h a una temperatura de 25-28 °C está representada en la tercera barra, a 37 °C con incubación de 2 h está representada en la tercera barra, cuarta y quinta barra representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C durante 4 h. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

El área que recorrieron los espermatozoides en este experimento en el testigo (0 h) fue de $3.72 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$. El promedio de la incubación durante 2 h a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) fue de $3.65 \pm 0.25 \mu\text{m}^2$. A las 4 h el promedio del área que recorrieron los espermatozoides humanos fue de $3.42 \pm 0.04 \mu\text{m}^2$, a 37 °C en un lapso de incubación de 2 h fue de $3.55 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$ y finalmente a las 4 h de incubación el promedio fue de $3.5 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ como se muestra en la figura

25. Se presentó diferencia significativa en los espermatozoides capacitados en un periodo de 0 h y a temperatura ambiente con una incubación de 4 h.

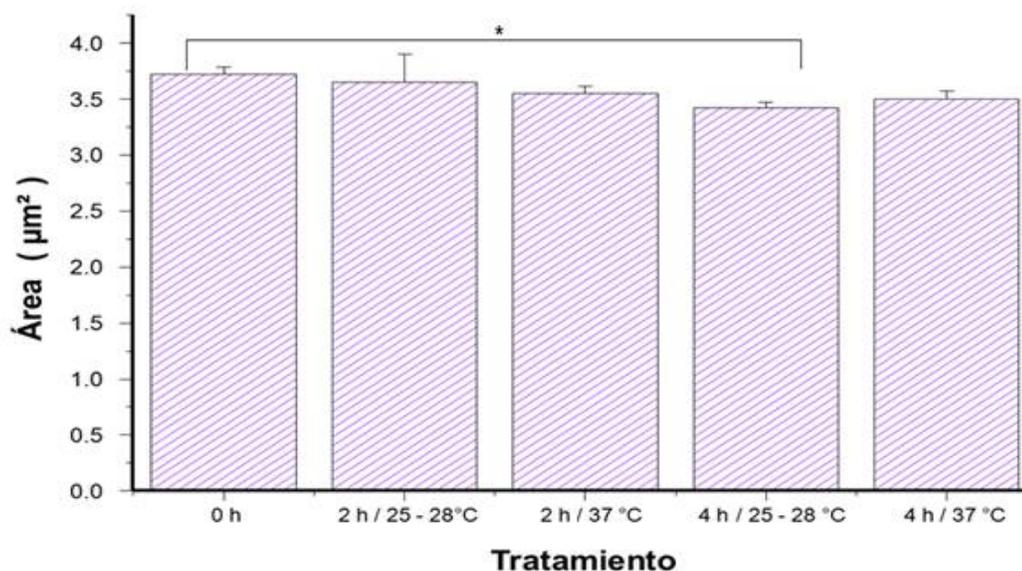


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre el área que recorrieron los espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de $n=4$. La primera barra representa a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), la incubación de espermatozoides durante 2 h se encuentra representada en la segunda y tercera barra a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C respectivamente, las últimas 2 barras de la gráfica representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C durante 4 h. El asterisco (*) muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los espermatozoides incubados 4 h a temperatura ambiente con el testigo.

En la figura 26 se representan los promedios de la elongación en los espermatozoides humanos; en el testigo (0 h) se obtuvo un promedio de 71.25 ± 2.86 %. A una temperatura de 37 °C con un tiempo de incubación de 2 h fue de 71.75 ± 0.85 % y a 4 h con una temperatura de incubación de 37 °C el promedio fue de 73.75 ± 1.03 %. Mientras que a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) el promedio fue de 69.5 ± 2.21 % a las 2 h y 68.5 ± 1.55 % en la medición realizada a las 4 h. Se presentó diferencia significativa entre los espermatozoides capacitados en un periodo de incubación de 4 h a temperatura ambiente y a 37 °C por el mismo tiempo.

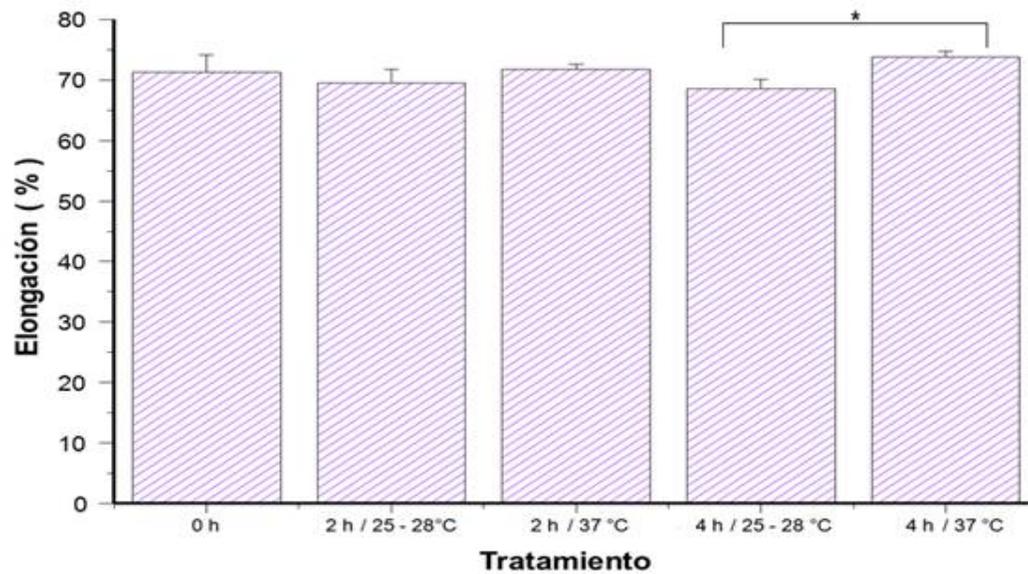


Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la elongación de los espermatozoides humanos capacitados. La gráfica representa la medias \pm ES de una de n=4. La primera barra representa a los espermatozoides incubados a 0 h (testigo), la segunda y tercera barra representan la incubación de espermatozoides durante 2 h a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C respectivamente, cuarta y quinta barra representan los espermatozoides incubados a temperatura ambiente 25-28 °C y a 37 °C durante 4 h. El asterisco (*) muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los espermatozoides incubados 4 h a temperatura ambiente con los incubados a 37 °C.

Con la finalidad de comparar los resultados de los parámetros cinemáticos en los espermatozoides incubados a 37 °C y a 25-28 °C durante 4 h se presenta la siguiente tabla:

Tabla 1. Parámetros cinemáticos en espermatozoides capacitados a 37 °C y a 25 - 28 °C durante 4 h		
Parámetros	37 °C	25 – 28 °C
VCL	103.9 ± 3.34	85.6 ± 4.20
VSL	54.8 ± 5.43	36.52 ± 1.72
VAP	63.1 ± 4.20	47.67 ± 2.00
LIN	50.25 ± 4.87	42.25 ± 2.59
STR	80.75 ± 3.94	72.25 ± 1.93
ALH	4.85 ± 0.27	4.65 ± 0.32
BCF	29.27 ± 0.31	22.52 ± 0.68
Movilidad total	85.75 ± 2.71	80.75 ± 4.04
Progresivos	54.25 ± 8.03	37.75 ± 4.09
Área	3.5 ± 0.07	3.42 ± 0.04
Elongación	73.75 ± 1.03	68.5 ± 1.55

Tabla 1. Representa las medidas registradas por el sistema computarizado CASA en los experimentos realizados a una temperatura de 37 °C y a temperatura ambiente en un periodo de incubación de 4 h con espermatozoides capacitados.

VII. DISCUCION

Los resultados en este estudio mostraron que la temperatura ambiente del laboratorio (25 - 28 °C) no presento un efecto sobre las poblaciones de espermatozoides capacitados *in vitro* en la $[Ca^{2+}]_i$, potencial de membrana, pH_i , y la movilidad total no fue afectada.

David y colaboradores en 1972 encontraron que en la ovulación de conejos, existe una diferencia de temperatura entre el sitio del depósito de los espermatozoides, (más frio) y el sitio de la fertilización (más caliente).

Estos descubrimientos plantearon la posibilidad de que la diferencia de temperatura podría servir como señal para guiar a los espermatozoides al sitio de fecundación. Posteriormente Bahat y colaboradores en 2003, demostraron que los espermatozoides humanos y de conejo tienen la capacidad de detectar pequeñas diferencias de temperatura de 0.5° C o incluso temperaturas más bajas y responder a ella por termotaxis indicando que los espermatozoides capacitados son termosensibles.

Este conjunto de hallazgos muestran que la temperatura es un factor que influye sobre los procesos relacionados con la fertilización *in vivo*, debido a que tiene un efecto modulador.

Sin embargo, en los experimentos que son realizados *in vitro*, los espermatozoides humanos se incuban a 36 ó 37 °C y son sometidos con frecuencia a las variaciones de la temperatura ambiente del laboratorio durante su preparación.

Simultáneamente existen diferencias entre los experimentos que son realizados *in vitro* y lo que ocurre *in vivo* en el oviducto, esto se debe considerar para conocer completamente estos procesos fundamentales y obtener información sobre las respuestas fisiológicas del espermatozoide mediante los canales iónicos.

La fertilización es un proceso complejo que necesita una serie de condiciones entre ellas se encuentra la concentración de Ca^{2+} ; que tiene un papel importante en los espermatozoides de invertebrados y vertebrados (Yanagimachi, 1994).

Por lo tanto, la medición de los canales iónicos en particular los de Ca^{2+} es fundamental. Además de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el potencial de membrana, el pH_i y la movilidad en los espermatozoides capacitados también son factores centrales en la actividad y control de la fertilidad cuando se encuentran en el tracto reproductor femenino.

Los espermatozoides en este estudio fueron inducidos con progesterona para simular las condiciones *in vivo* del tracto reproductor femenino. La progesterona *in vivo* se encuentra en altas concentraciones (micromolares) en el líquido folicular y es sintetizada, antes y después de la ovulación, por las células del *cumulus oophorus* que rodean al ovocito (Meizel *et al.*, 1997).

La exposición de los espermatozoides capacitados a la progesterona, en dosis micromolares, tanto *in vivo* como *in vitro*, estimula la señalización y provoca un aumento inmediato en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (dentro de segundos) (Bedu-Addo *et al.*, 2005; Publicover *et al.*, 2007).

En este trabajo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides capacitados a 37 °C y a temperatura ambiente del laboratorio (25 - 28 °C) muestran un incremento gradual, alcanzando su máximo nivel de concentración en un periodo de 4 h.

Estos valores indican que los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente del laboratorio mantienen una concentración intracelular adecuada de Ca^{2+} permitiendo la activación de cinasas y segundos mensajeros; que son esenciales para la capacitación, este flujo de calcio también está implicado con la permeabilidad de la membrana plasmática.

Varios hallazgos en espermatozoides de distintas especies de mamíferos, muestran que existe una hiperpolarización de la membrana plasmática cuando están capacitados, la cual es necesaria para que ocurra la reacción acrosómica (López *et al.*, 2014)

Se ha demostrado que en los espermatozoides cuando se encuentran en el epidídimo, contienen grandes cantidades de colesterol en la membrana plasmática; que ayudan a estabilizarla (Yanagimachi, 1994). Un estudio realizado con registros electrofisiológicos reveló que la eliminación del colesterol en la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados por medio de la albumina permite que sea más fluida (Cross, 1998). Este aumento en la fluidez y en el potencial de membrana, es descrito como hiperpolarización (Brewis *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto al potencial de membrana en los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente del laboratorio (25 - 28 ° C) muestran una hiperpolarización en la membrana plasmática semejante con los espermatozoides incubados a 37 °C. Por lo tanto, la temperatura ambiente no afecta la hiperpolarización y la fluidez de la membrana. Además de la hiperpolarización en la membrana plasmática, la capacitación espermática también está relacionada con una ligera alcalinización de pH_i en los espermatozoides.

La regulación intracelular del pH_i es esencial para la función celular (Nishigaki *et al.*, 20014). En la mayoría de las especies, los espermatozoides inmóviles se almacenan en el testículo (epidídimo en caso de lo mamíferos). En general se cree que en este estado de reposo el espermatozoide se mantiene por la acidificación del pH_i , ya que las ATPasas de dineína que son proteínas motoras que generan el latido flagelar, son altamente dependientes de pH (Giroux *et al.*, 1991).

Cabe mencionar, que en espermatozoides capacitados la eliminación de varios transportadores y enzimas que son dependientes del pH_i o de alguna manera relacionados con la regulación de este provocan infertilidad. Por lo tanto, es claro que la regulación del pH_i también es de suma importancia para la fisiología espermática.

Bajo las condiciones realizadas en este experimento el pH_i de los espermatozoides capacitados, a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) y 37 °C en un periodo de 4 h fue similar. Lo que indica que la temperatura ambiente no afecta el pH_i de los espermatozoides capacitados, permitiendo la movilidad de estos.

La movilidad espermática se encuentra asociada con la capacidad fertilizante, y es esencial para el transporte de los espermatozoides a través del tracto genital femenino (Verstegen *et al.*, 2002).

Existen características de movilidad específicas de cada especie, pero parece ser que existen elementos comunes en la movilidad hiperactiva de los espermatozoides. Este tipo de movilidad ha sido observada en el lugar y momento de la fecundación y parece, por tanto, ser esencial para que ésta se lleve a cabo con éxito (Suárez y Ho, 2003).

Observaciones experimentales indican que una de las funciones fisiológicas de la hiperactivación, es la de mantener un movimiento progresivo en los fluidos viscosos que se encuentran en el tracto genital femenino, como el moco cervical. También es importante, ya que al espermatozoide le facilita la penetración de la matriz extracelular de las células de la ZP (Guerrero *et al.*, 2011).

Asimismo, la movilidad también es un parámetro importante para evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

El uso del CASA en este trabajo nos ha permitido establecer con más detalle el efecto de la temperatura ambiente en diferentes componentes de movimiento de los espermatozoides humanos, más allá del análisis dado por las determinaciones visuales normalmente realizadas en las clínicas.

En este experimento la temperatura ambiente influyó en la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides, provocando que los espermatozoides no recorrieran la misma distancia que los que fueron incubados a 37 °C al realizar la observación en el CASA.

La velocidad rectilínea (VSL) en los espermatozoides humanos incubados a 37 °C en un periodo de 4 h fue superior, esto indica que la distancia en línea recta recorrida entre el primer y el último punto de la trayectoria del espermatozoide fue afectada por la temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos de la velocidad de la trayectoria media (VAP), muestran que la distancia y dirección promedio que el espermatozoide ha viajado en el periodo de observación fue perturbada por la temperatura de incubación. Los espermatozoides capacitados a 37 °C tuvieron mayor velocidad de la trayectoria media.

Se ha encontrado que los espermatozoides que presentan movilidad lineal tienen mucho más fuerza que los espermatozoides hiperactivos, Esta fuerza puede estar relacionada con el trabajo que el espermatozoide realiza en el micro-ambiente, generando más fuerza en el patrón de movimiento flagelar asociado a la región del *cumulus* que es altamente viscosa (Westphat *et al.*, 1993).

La linealidad (LIN) que presentaron los espermatozoides incubados en este experimento; tanto a temperatura ambiente como a 37 °C fue similar; esto indica que el movimiento que realizaban dentro de la trayectoria curvilínea era recto.

Los valores obtenidos sobre la rectitud de la trayectoria media (STR), en espermatozoides incubados en un lapso de 4 h a 37 °C fueron equivalentes, por lo que ambas poblaciones de espermatozoides mantenían rectitud en el promedio de la trayectoria que realizaron mediante el análisis.

Los datos adquiridos respecto al promedio de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) fueron semejantes en ambas poblaciones de espermatozoides, presentaban la misma amplitud de movimiento lateral de la cabeza durante el recorrido que realizaban.

Los resultados obtenidos mediante la digitalización de las imágenes espermáticas revelan que los espermatozoides progresivos, el área total y la movilidad total que

recorrieron los espermatozoides capacitados a 37 °C y a temperatura ambiente no fue afectada.

En conjunto, las variaciones antes mencionadas en los parámetros cinemáticos (VCL, VSL, VAP) manifiestan que los espermatozoides capacitados a temperatura ambiente no recorren la misma distancia, además de que la orientación que llevan se encuentra por debajo de los valores que se obtuvieron en los espermatozoides incubados a 37 °C.

Lo que indica que los espermatozoides seguían moviéndose, recorriendo la misma distancia y que ambas poblaciones mantenían un movimiento progresivo, pero que la velocidad no era la misma con respecto a los incubados a 37 °C.

Los resultados obtenidos respecto a la velocidad de los espermatozoides incubados a temperatura ambiente fue afectada, pero sería interesante realizar estudios para determinar si esta deficiencia en la velocidad del movimiento afecta a los espermatozoides al tratar de realizar la reacción acrosómica, debido a que aún existen muchas preguntas con respecto a la función fisiológica de los canales iónicos y que todavía están sin respuesta para entender cómo estas células fundamentales operan y lograr la fertilización.

La movilidad hiperactiva está relacionada con la reproducción, sin embargo, es importante conocer más a fondo cómo funciona la fisiología del espermatozoide, por lo que se propone que se realicen mediciones sobre la fosforilación de la proteína tirosina en espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente.

Finalmente los resultados de este experimento sugieren que los espermatozoides humanos pueden ser capacitados e incubados a temperatura ambiente para evitar los cambios de temperatura en las preparaciones *in vitro*.

VIII. CONCLUSIONES

- La $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides incubados por 2 y 4 horas a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) mostraron un comportamiento similar con respecto a los espermatozoides capacitados a 37 °C.
- El potencial de reposo de los espermatozoides incubados a temperatura ambiente del laboratorio y a 37 °C por 4 horas no afectó la despolarización de la membrana en los espermatozoides humanos capacitados.
- El pH_i de los espermatozoides incubados a temperatura ambiente del laboratorio y a 37 °C no fue afectada por la incubación a temperatura ambiente.
- La movilidad de los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente en los parámetros VCL, VSL, VAP mostraron una velocidad menor que los incubados a 37°C.
- La movilidad de los espermatozoides en cuanto a la trayectoria lineal, el desplazamiento lateral de la cabeza, la movilidad total y el área que recorrieron los espermatozoides no fue afectada por la temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C).
- Los hallazgos en los resultados de los parámetros evaluados muestran y permiten validar la hipótesis de investigación del presente trabajo al comprobar que la incubación a temperatura ambiente del laboratorio (25-28 °C) promueve de manera eficiente los mecanismos celulares implicados en la capacitación espermática como ocurre con los espermatozoides incubados a 37 °C.

IX. PERSPECTIVAS

- Realizar mediciones sobre la fosforilación de la proteína tirosina a temperatura ambiente.
- Analizar los efectos de la temperatura ambiente sobre la reacción acrosómica.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. (1980). Sperm motility. *Fertil Steril*. 134: 197-215.
- Bahat A, Tur-Kaspa I, Gakamsky A, Giojalas LC, Breitbart H, Eisenbach M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Med*. Pp 149-150.
- Bahat A, Eisenbach M. (2006). Sperm thermotaxis. *Mol cell Endocrinol*. 252(1-2): 115-9.
- Bedu-Addo K, Lefievre L, Moseley FL, Barratt CL, Publicover SJ. (2005). Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly "switch" capacitation-induced events in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 11(9): 683-91.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M. (1999). Primer-calcium signaling. *Current Biology* 9: 157-159.
- Blackmore PF, Eisoldt S. (1999). The neo glycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-Type calcium channels in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod*. 5(6): 498-506.
- Boryshpolets Sergii, Pérez-Cerezalez S, Eisenbach M. (2015). Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Hum Reprod*. 30(4): 884-892.
- Boyers SP, Davis RO, Katz DF. (1989). Automated semen analysis. *Current Probl Obstet Gynecol Fertile* 12: 167-200.
- Breitbart H. (2003). Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol*. 49: 321-327.
- Brewis IA, Morton IE, Moore HD. (2001). Zona solubilizado proteínas pelúcida y progesterona inducen la entrada de calcio y la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados de perro. *Mol Reprod Dev*. 60: 491-7.
- Browder LW, Ericsson CA, Jeffery WR. (1991). Developmental Biology. *Edit Saunders Collage Publishing New Cork*. Cap 3.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 79-84.
- Buxadé C. (1995). Zootecnia: Bases de la producción animal. *Mundi-Prensa Libros*. Tomo II.350-370.
- Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J. (2000). Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K⁺ channels IKr and IKs. *Therapie* 55: 195-202.

- Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI. (1997). Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J Hypertens Suppl.* 15(5): 17-25.
- Cohen J, Fehilly CB, Walters DE. (1985). Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator. *Fertil Steril* 44: 254–262.
- Cohen AD, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M.(1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* pp: 11039-11043.
- Cohen G, Rubinstein S, Gur Y, Breitbart H. (2004). Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev. Biol.* 267: 230-241.
- Cross NL. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59: 7–11.
- Cui G, Okamoto T, Morikawa H. (2004). Spontaneous opening of T-type Ca^{2+} channels contributes to the irregular firing of dopamine neurons in neonatal rats. *J. Neurosci.* 24(49): 11079-11087.
- Curry MR, Watson PF. (1995). Sperm structure and function. Gametes: The spermatozoon. *Cambridge University Press.* Cap 3: 45-69.
- Czirjak G, Enyedi P. (2006). Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K^+ channels. *Mol. Pharmacol.* 69(3): 1024-32.
- Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, Nishigaki T, Treviño C, Word C, Beltran C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91:1305-1355.
- David A, Vilensky A, Nathan H. (1972). Temperature changes in the different parts of the rabbit's oviduct. *Int j. Gynaecol. Obstet* 10: 52-56.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darzon A, Visconti PE.(2003).Involvement of a Na^+/HCO_3^- cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* 278: 7001-7009.
- Dobrinski I, Smith T, Suarez SS, Ball BA. (1997). Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 56(4): 861-869.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. (1999). Intracellular Ca^{2+} , Mg^{2+} ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 61: 1226-1234.
- Eisenbach M. (1999). Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* pp: 56-66.

- Eisenbach M, Tur-Kaspa I. (1999). Do human eggs attract spermatozoa. *Bio Essays*. 21: 203-210.
- Feki N, Therond P, Couturier M, Limea G, Legrand A, Jouannet P. (2004). Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Human Reprod*. 10(2): 137-142.
- Flesch F, Gadella B. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of the fertilization. *Biochim. Biophys.* 1469: 197-235.
- Florman H, Corron M, Kiim T, Badcock D. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 152: 304-314.
- Foldesy RG, Bedford JM. (1982). Biology of the scrotum. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat caudal epididymidis. *Biol. Reprod.* 26(4): 673-82.
- Gadella BM, Harrison RA. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod.* 67: 340-350.
- Garbers DL, Tubb DJ, Hyne RV. (1982). A requirement of bicarbonate for Ca²⁺ induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem* 25: 8980-8984.
- Giroux WP, Jouannet P, Pignot-Paintrand I, Feneux D. (1991). Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with Triton X-100. *Mol Reprod Dev.* 29 (2): 157-162
- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA, Guzmán-Grenfell AM. (2003). Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives in Biochemistry Biophysics.* 408: 205-210.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tiesen Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
- Guzmán-Grenfell AM, Bonilla-Hernández MA, González-Martínez MT. (2000). Glucose induces a Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase-dependent transient hyperpolarization in human sperm. I. Induction of changes in plasma membrane potential by the proton ionophore CCCP. *Biochim. Biophys. Acta.* 1464: 188-198.
- Guerrero A, Carneiro J, Pimentel A, Wood CD, Corkidi G, Darszon A. (2011). Strategies for localizing the female gamete: the importance of measuring trajectories in three spatial dimensions. *Mol Hum Reprod.* 17: 511-523.
- Harrison R A. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev.* 8: 581-594.

- Harrison RA. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev.* 67: 337-352.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* 202(3): 663–671.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suárez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell.* 9: 249-259.
- Ho HC, Suarez SS. (2003). Caracterización de calcio intracelular en la base del flagelo espermático que regula la movilidad hiperactivada. *Biol. Rep.* 68: 1590-1596.
- Hunter RHF. (1981). Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil.* 63(1): 109-117.
- Hunter RHF. (1998). Sperm-epithelial interactions in the isthmus and ampulla of the Fallopian tubes and their ovarian control. *Gametes: Development and function.* Pp: 355-367.
- Hunter RHF, Nichol R. (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and the ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J.Reprod Fert.* 599-606.
- Jaiswal BS, Eisenbach M. (2002). Sperm-oviduct interactions. *D.M. Hardy Fertilization, Academic Press.* Pp 57-117.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature.* 439 (7077): 737–740.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. (1983). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol. Reprod.* 29: 173–179.
- Linares Hernández L, Guzmán Grenfell AM, Hicks Gómez JJ, González Martínez MT. (1988). Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys.* 1372: 1-12.
- López-González I, De La Vega-Beltrán JL, Santi CM, Florman HM, Felix R, Darszon A. (2001). Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells and the zonapellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 236: 210–219.
- López GI, Torres RP, Solís LA, Santi CM, Darszon A, Treviño CL. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 20 (7): 619-29.
- Lotshaw DP. (2001). Role of membrane depolarization and T-type Ca^{2+} channels in angiotensin II and K^{+} stimulated aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 175 (1-2): 157-171.

- Mahi CA, Yanagimachi R. (1973). The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35 (1): 55-66.
- Makler A, Makler-Shiran E, Stoller J, Lissak A, Abramovici H, Blumenfeld Z. (1992). Use of a sealed mini-chamber to investigate human sperm motility in real time under aerobic and anaerobic conditions. *Arch. Androl.* 29: 255-61.
- Marín-Briggiler CL, Tezón JG, Miranda PV, Vázquez-Letvin MH. (2002). Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 77(2): 252-259.
- Meizel S, Turner KO, Nuccitelli R. (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* 1; 182(1): 65-75.
- Miller D, Ostermeier GC. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update.* 12(6): 757-767.
- Mbizvo MT, Burkman LJ, Alexander NJ. (1990). Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril.* 54: 708-712.
- Mortimer ST, Mortimer D. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal Andrology.* 11: 3
- Mortimer ST. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update.* 3(5):403-439.
- Mortimer ST. (1998). Minimum sperm trajectory length for reliable determination of the fractal dimension. *Reprod Fertil Dev.* 10(6): 465-9.
- Mortimer ST. (2000). CASA: Practical aspects. *J. Androl* 21: 515-524.
- Neri Vidaurri P, Tesis de Maestría. (2007). Sensibilidad de los canales de canales dependientes de voltaje al Phi en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador de AMPc Posgrado de Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. UNAM. 58 pp.
- Neri Vidaurri P, Torres Flores V, González-Martínez MT. (2006). A remarkable increase in the pH sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 105-109.
- Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. (2014). Intracellular pH in the sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 450(3): 1149-58.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colom Ciencia Pecuaria.* 19: 4.

- Ostermeier GCH, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl.* 22: 595-603.
- O'toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. (2000). Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11: 1571-1584.
- Owen DH, Katz DF. (1993). Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J. Androl* 14: 210-221.
- Pedersen H. (1972). Further observations on the fine structure of the human spermatozoon. *Z. Zelforsch* 123: 305-315.
- Phillips DM. (1970). Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J.Ultrastruct. Res.* 58: 144-154.
- Publicover S, Harper CV, Barratt C. (2007). [Ca²⁺] signaling in sperm making the most of what you've got. *Nat Cell Biol.* 9 (3): 235-42.
- Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P. (1991). Sperm attraction to follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2840-2844.
- Rodríguez-Martínez, H., Ekstedt, E., Einarsson, S., (1990). Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13, 238-243.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65: 245-259.
- Schuel H, Burkman LJ. (2005). A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol. Reprod.* 73(6): 1078-1086.
- Si Y. (1997). Temperature-dependent hyperactivated movement of hamster spermatozoa. *Biol Reprod.* 57: 1407-1412.
- Suarez SS, Dai X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* 46(4): 686 – 691.
- Suarez SS. (2002). Gamete transport. *Fertilization, Academic Press, San Diego.* pp: 3-28
- Suarez SS, Ho HC. (2003). Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol* 49(3): 351-6
- Suarez SS, Pacey AA. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12: 23-37.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.* 35(1):1-10.

Tash JS, Bracho GE. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl.* 15(6): 505-509.

Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, and González-Martínez M.T. (2011). Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod.* 26: 2626-35.

Torres-Flores VM. Tesis de Doctorado (2011). El aumento del sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio externo regula la movilidad del espermatozoide humano. Facultad de Ciencias. UNAM. 79 pp.

Tur-Kaspa I. (1992). Pathophysiology of the Fallopian tube. *Wiley-Liss*. pp 5-14.

Turner RM. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 18 (1-2): 25-38.

Vadnais ML, Galatino-Homer HL, Althouse GC. (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch. Androl.* 53: 109-123.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 1; 57 (1): 149-79

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137.

Visconti PE, Kopf GS. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm. *Biol Reprod* 59(1): 1-6.

Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53: 133-150.

Waggoner AS. (1979). Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys Bioeng.* 8: 47-68.

Wallace E, Cooper GW, Calvin HI. (1983). Effect of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gam Res.* 7: 389 - 399.

Westphal LM, Dansasouri I, Shimizu S. (1993). Exposure of human spermatozoa to the cumulus oophorus results in increased relative force as measured by 760 nm laser optical. *Hum Reprod* 8: 1083 – 1086.

WHO (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press.

Yanagimachi R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 18: 275-286.

Yanagimachi R. (1990). Capacitation and the acrosome reaction. *Gamete Physiology* p.31

Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. 2nd ed. New York 189 -317.

Zeng Y, Clark EN, Florman HM. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171: 554-563

XI. ANEXOS

Anexo A

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado sucesivas ediciones del “Manual para el examen del semen Humano” siendo el último en el año 2010. Estos manuales sirven de guía en los laboratorios para evaluar la calidad seminal. Los parámetros analizados en este examen y sus valores de referencia son:

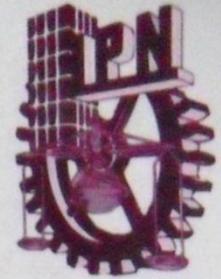
Examen macroscópico	
Licuefacción	15-60 min.
Color	Blanco-grisáceo
Volumen	2-6 ml
Viscosidad	Homogénea
Ph	7-8

Examen microscópico	
Concentración espermática	$\geq 20 \times 10^6$
Movilidad espermática	> 50%
Morfología	> 14% de espermatozoides normales

Anexo B

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

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



XXXV CONGRESO NACIONAL DE AMEFAR

**XI CONGRESO DE INVESTIGACIÓN EN
MEDICINA ESM-IPN**

**XIV CONGRESO ESTUDIANTIL DE FARMACOLOGÍA
EN HONOR AL DR. ENRIQUE HONG CHONG**

**75° ANIVERSARIO
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA IPN**

**15 A 18 DE MAYO DE 2013
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA IPN
Ciudad de México**

299. Título: IMPORTANCIA DE LA TEMPERATURA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS
Autor(es): Zandibel Díaz Rebolgar, Yadira Libertad Hernández-Rueda, Víctor Manuel Torres Flores.
Tutor: Víctor Manuel Torres Flores.
Institución: Facultad de Medicina.
<p>Resumen: La reproducción sexual requiere de la comunicación entre los gametos: el espermatozoide y el óvulo. En los mamíferos, los espermatozoides eyaculados son móviles, pero todavía no cuentan con la capacidad para unirse y fecundar al gameto femenino. Para poder fecundar el óvulo, el espermatozoide de mamíferos debe experimentar procesos fisiológicos como la capacitación, hiperactivación de movilidad, y reacción acrosomal. Sin embargo los mecanismos moleculares involucrados no se conocen con detalle. En estos procesos suceden cambios que involucran la modulación de los mecanismos de entrada de Ca^{2+}. El Ca^{2+} extracelular juega un papel importante en la movilidad, ya que es requerido para la iniciación y mantenimiento de la movilidad hiperactivada.</p> <p>Se trabajó con muestras de espermatozoides normospermicos no capacitados y capacitados para la determinación de Calcio Intracelular (fura-ff, detector de calcio), potencial de membrana (dISC(3)(5)) medidos simultáneamente en poblaciones de espermatozoides humanos y determinación de pHi (BCECF) individualmente. La movilidad se determinó mediante el uso del sistema CASA, que permite la cuantificación de los niveles de movilidad espermática todas en respuesta a progesterona.</p> <p>El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de la capacitación de los espermatozoides humanos a temperatura ambiente (25°C).</p> <p>Resultados: Los espermatozoides incubados a 25°C por 4 horas muestran un aumento en el flujo de calcio intracelular, un aumento en el pHi, y una ligera despolarización de la membrana comparado con los no capacitados. El porcentaje de espermatozoides que aumentan su hiperactividad de la movilidad se ve afecta al incubar a los espermatozoides en un medio de capacitación por 4 horas a 25°C, a diferencia de los no capacitados.</p> <p>Sugiriendo que la incubación de los espermatozoides humanos en un medio suplementado con albumina y bicarbonato por 4 horas, podría ser suficiente para que se capaciten.</p>

300. Título: EFECTOS FARMACOLÓGICOS DEL LOSARTAN
Autor(es): Zavala Alvarado Gonzalo Iván, Hernández Delgado Gloria Patricia, Solís Recéndez Ma. Guadalupe.
Tutor:
Institución: Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas.
<p>Resumen: La hipertensión arterial es actualmente considerada uno de los problemas de salud de mayor prevalencia e incidencia en México. El sistema renina-angiotensina-aldosterona desempeña un rol crucial en la regulación de la presión arterial mediante la producción de la angiotensina II (ATII), que además de inducir vasoconstricción, también promueve la secreción de aldosterona, estimula el crecimiento y proliferación vascular, e induce disfunción endotelial. Debido a que el desarrollo de la hipertensión y la enfermedad cardiovascular están mediadas por la producción de ATII que interactúa principalmente con el receptor AT1, una estrategia farmacológica en su terapéutica es promover la inhibición de este sistema. El losartan, antagonista del receptor AT1 (ARA-II) es eficaz como antihipertensivo y además presenta propiedades cardioprotectoras al disminuir la hipertrofia ventricular. Este agente se usa comúnmente en pacientes que no toleran los inhibidores de la ECA. Por su efecto hipotensivo, el losartan presenta efectos protectores en diversos órganos, incluyendo la función renal, la función del endotelio vascular, la agregación plaquetaria y la aterosclerosis. El uso concomitante con bajas dosis de hidroclorotiazida (HCTZ) genera un efecto antihipertensivo aditivo, y a pesar que la HCTZ induce hipotasemia, hiperglucemia y daño renal, los ARA-II como el losartán tienden a contrarrestar estos efectos, pues se ha reportado que el uso de ARA-II en combinación con HCTZ no empeora la tolerancia a la glucosa, pero sí mejora la presión arterial, la resistencia a la insulina y la sensibilidad a ésta última en pacientes hipertensos no diabéticos. La evidencia aquí presentada permite proponer diversas posibilidades de uso terapéutico.</p>



XXXV Congreso de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.
XI Congreso de Investigación en Medicina ESM-IPN
XIV Congreso Estudiantil de Farmacología en Honor al Dr. Enrique Hong Chong
75°. Aniversario de la Escuela Superior de Medicina del IPN



Otorgan constancia a:
Zandibel Díaz Rebolgar, Yadira Libertad Hernández-Rueda, Víctor Manuel Torres Flores



Por la presentación del trabajo titulado:

Importancia de la temperatura en espermatozoides humanos en los procesos fisiológicos.



Ciudad de México, D. F., del 15 al 18 de mayo de 2013.
Por el Comité Organizador

Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo
Directora de la ESM – IPN

Dr. Augusto Bondani y Guasti
Presidente de AMEFAR