

El espermatozoide: una mirada desde México



Casa abierta al tiempo



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN



INSTITUTO DE FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA
DEL ESPERMATOZOIDE



INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA UNAM

El espermatozoide: una mirada desde México

EDITH ARENAS RÍOS
GISELA FUENTES MASCORRO
Coordinadoras



Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, México
Universidad Autónoma Metropolitana, México
Universidad Nacional Autónoma de México, México
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
Universidad Autónoma de Tlaxcala, México
Universidad Autónoma del Estado de México, México
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco
Suárez”, México
Instituto de Geriátría, México
Universidad de Syracuse, Estados Unidos de Norteamérica

Citar los capítulos del libro de la siguiente forma:

Nombre del autor (es). (Año). Nombre del capítulo. *Nombre del libro* (pp. - pp.).

Lugar de edición: Editorial

La presente edición fue financiada parcialmente con recursos
del PFCE 2018.

El espermatozoide: una mirada desde México

© 2019

D. R. © Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca

Primera edición, 2019

ISBN versión electrónica: 978-607-9061-69-2

ISBN versión impresa: 978-607-9061-68-5

Servicios editoriales Scriptus
www.scriptus.com.mx

Impreso en México

El espermatozoide: una mirada desde México

EDITH ARENAS RÍOS
GISELA FUENTES MASCORRO
Coordinadoras



CONTENIDO

Presentación	9
La evolución de las proteínas reproductivas y la diversificación del espermatozoide ALBERTO VICENS Y STEPHEN DORUS	11
El papel de los epididimosomas en la transferencia de proteínas durante la maduración epididimaria AHIEZER RODRÍGUEZ TOBÓN, EDITH ARENAS RÍOS Y CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ	44
Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico en la fisiología del espermatozoide del erizo de mar CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ	60
Caspasas en espermatozoide BLANCA PATRICIA LÓPEZ TRINIDAD, MINA KONIGSBERG FAINSTEIN, ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ Y EDITH ARENAS RÍOS	101
Características del eyaculado y el espermatozoide de las serpientes GISELA FUENTES MASCORRO, AGUSTÍN ÁLVAREZ TRILLO, DIOSELINE GIRÓN GUTIÉRREZ, PABLO ROGELIO SIMÓN SALVADOR, MAYRA BAUTISTA MEDEL Y HÉCTOR DAVID TAMAYO MARTÍNEZ	119
El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación espermática ERNESTO RODRÍGUEZ TOBÓN, REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA, HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ, PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA Y EDITH ARENAS RÍOS	136

Fitoestrógenos: un ejemplo de perturbador endocrino	153
MA. DEL ROSARIO TARRAGÓ CASTELLANOS Y EDITH ARENAS RÍOS	

Implicaciones actuales de la obesidad en la fertilidad masculina	174
LORENA RUIZ VALDERRAMA, ROMÁN ESPINOSA CERVANTES, IRERI FRAGOSO HERNÁNDEZ, ISABEL ARRIETA CRUZ, HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ, MA. DEL ROSARIO TARRAGÓ CASTELLANOS, LETICIA GONZÁLEZ NÚÑEZ, MARCELA ARTEAGA SILVA Y EDITH ARENAS RÍOS	

Efecto de la exposición al cadmio sobre los carbohidratos de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas de espermatozoides epididimarios de la rata Wistar	193
JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, SERGIO MONTES LÓPEZ, ISABEL ARRIETA CRUZ, EDITH ARENAS RÍOS, IRMA JIMÉNEZ MORALES Y MARCELA ARTEAGA SILVA.	

Efecto de los compuestos perfluorados en la reproducción	231
MARIO TETELTITLA SILVESTRE, VERÓNICA SOUZA ARROYO, JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE, ALEJANDRO DOMÍNGUEZ CAMPUZANO, DIANA LISBETH FLORES MARTÍNEZ E YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ	

Morfofisiología del epidídimo y de los espermatozoides de la rata Wistar después de la saciedad sexual	256
YOLANDA LÓPEZ RAMÍREZ, ROSA ANGÉLICA LUCIO, EDITH ARENAS RÍOS, JOSÉ LUIS TLACHI LÓPEZ, LORENA RUIZ VALDERRAMA Y MARIO GARCÍA LORENZANA	

Comparación de la conservación <i>in vitro</i> y capacidad fertilizante <i>in vivo</i> del semen de conejo refrigerado con dos diluyentes	275
MARCELA HERNÁNDEZ RAMÍREZ, JUAN GABRIEL RIVERA MARTÍNEZ, YAZMÍN ELIZABETH FELIPE PÉREZ Y JORGE ANTONIO GONZÁLEZ SANTOS	

PRESENTACIÓN

Los grupos de investigación Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y los miembros del Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA) de la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca iniciaron las Jornadas Estatales de Reproducción en el año 2010, con el objetivo de abrir un espacio en el que los estudiantes de ambos grupos pudieran mostrar sus avances de investigación. Es decir, brindarles un foro crítico que les permitiera expresarse con toda libertad para hacer cuestionamientos desde el nivel más básico y con ello construir conocimientos firmes. Este foro ha crecido año con año, incluyendo talleres que les posibilita estandarizar las técnicas que emplean en el laboratorio, así como realizar primeras incursiones como capacitadores. Los talleres han abordado desde temas prácticos de campo como la inseminación artificial y la transferencia de embriones en ovinos y caprinos, hasta la evaluación y congelación de semen en el laboratorio.

A lo largo de las jornadas se ha contado con la participación de miembros del grupo de Ecofisiología de la Reproducción de Vertebrados y el Cuerpo Académico de Fertilización de mamíferos, ambos de la UAM-I, del Dr. Ávalos, de la UAM-X, del Dr. Arturo Gómez, de la Universidad Autónoma del Estado de México, y en 2017 se firmó un acuerdo de colaboración académica entre los siguientes grupos: Grupo de Investigación: Biotecnología aplicada a la Veterinaria UABJO, Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del espermatozoide UAM-I, Consorcio de la fisiología del espermatozoide del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Puebla y la maestría en Biología de la Reproducción Animal UAM-I.

Para la mayoría de las personas el espermatozoide es “la otra célula que participa en la reproducción”, para nosotros es “una célula única, con características fascinantes que atrapa nuestra atención y nos mantiene eternamente asombrados”, por lo que deseamos que este libro le permita al lector acercarse a algunas de las contribuciones que se hacen desde México para ampliar el conocimiento sobre dicha célula.

Edith Arenas Ríos (UAM)
Gisela Fuentes Mascorro (UABJO)
Julio de 2018

LA EVOLUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS REPRODUCTIVAS Y LA DIVERSIFICACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

Alberto Vicens¹
y Stephen Dorus²

¹ Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 66210, Cuernavaca, Morelos, México.

² Department of Biology, Syracuse University, 248 Life Sciences Complex, Syracuse NY, USA.

1. Introducción

La evolución del sexo ha sido un tema de interés y debate científico desde la emergencia de la teoría de la evolución. A nivel celular, los últimos artífices encargados de culminar la reproducción sexual son los gametos: el espermatozoide y el óvulo. Dada su vital importancia para la supervivencia y la prevalencia de las especies, el conocimiento de estas dos células ha sido una de las principales inquietudes del ser humano a lo largo de nuestra historia. Particularmente, un gran número de hipótesis y estudios sobre el sexo se han enfocado en el espermatozoide, debido a su vital papel como transportador del material hereditario masculino y a su implicación en la fertilidad.

Los espermatozoides son células extremadamente especializadas y experimentan cambios genéticos, moleculares y fisiológicos que no se observan en otras células (Roldan y Gomendio, 2006). Desde el punto de vista evolutivo, los espermatozoides constituyen un modelo celular de interés excepcional, ya que se encuentran entre las células más divergentes de los seres vivos, presentando tamaños y formas muy variadas (Pitnick *et al.*, 2009). Durante los últimos 50 años se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de comprender los principios básicos y las fuerzas evolutivas que rigen su enorme diversificación. El cúmulo de estas investigaciones ha resultado en la identificación de distintas fuerzas selectivas que dirigen la adaptación de rasgos relacionados con la morfología,

almacenaje y función del espermatozoide (Birkhead *et al.*, 2008). Un factor determinante en la diversificación del espermatozoide son las fuerzas de selección sexual postcópula (SSPC), que implican todas aquellas barreras y desafíos que afrontan los espermatozoides desde su entrada en el tracto femenino hasta la fecundación. La SSPC va a imponer, por tanto, un control selectivo sobre la probabilidad de fecundación en función de las dotaciones genéticas y cualidades fenotípicas de los espermatozoides (Birkhead y Pizzari, 2002). A pesar del amplio conocimiento sobre los rasgos que han permitido a los espermatozoides y al eyaculado adaptarse tanto a sus ambientes reproductivos como a las fuerzas de SSPC, las bases moleculares de estos cambios adaptativos han permanecido inexplorados durante largo tiempo.

Las proteínas reproductivas –que aquí definiremos como todas aquellas que actúan después de la cópula e intervienen en el transporte, almacenaje y función de los gametos, así como en la fecundación– son cruciales en el sentido biológico, debido a que contribuyen a la generación de nuevos individuos. En términos evolutivos, dichas proteínas son elementos trascendentales por tres motivos principales: 1) afectan al resultado de las fuerzas de selección sexual postcópula, 2) median los conflictos reproductivos entre los sexos y 3) contribuyen a la formación de barreras de aislamiento reproductivo postcopulatorias y prezigóticas (PCPZ), lo que conduce a la formación de nuevas especies. Un aspecto interesante es que los genes que las codifican (a partir de aquí los denominaremos genes reproductivos) evolucionan con gran rapidez (Swanson y Vacquier, 2002); sin embargo, son pocas evidencias que han demostrado un impacto directo de la SSPC sobre la evolución adaptativa de los genes reproductivos.

Los últimos avances en las herramientas genómicas han permitido identificar las colecciones de genes expresados en los tejidos reproductivos. No obstante, el espermatozoide maduro es una célula transcripcionalmente inactiva y, por lo tanto, los métodos de transcriptómica no han sido eficaces sobre este sistema; tal obstáculo se ha visto superado con la aplicación de la proteómica al estudio del espermatozoide. El desarrollo de

herramientas de alto rendimiento basadas en espectrometría de masas (EM) ha permitido su utilización para caracterizar la composición molecular del espermatozoide en multitud de especies (McDonough *et al.*, 2016). En este capítulo revisamos el gran progreso logrado en la identificación masiva de proteínas del espermatozoide a través del uso de técnicas basadas en EM, y cómo estos métodos han contribuido a una mayor comprensión de la composición molecular del gameto masculino. A continuación, discutiremos cómo las técnicas de transcriptómica y proteómica se pueden integrar con análisis de genómica comparativa para identificar los grupos de genes reproductivos sujetos a selección positiva, y cómo estos hallazgos nos dan una idea de las fuerzas selectivas que han dirigido la evolución de los sistemas de reproducción. Por último, hablaremos de cómo los métodos emergentes de proteómica cuantitativa se pueden aplicar para conocer las respuestas primarias del espermatozoide a episodios de SSPC.

2. Caracterización del proteoma del espermatozoide

El espermatozoide maduro es una célula idónea para emprender estudios de proteómica, por tres razones: 1) es accesible, ya que se puede extraer fácilmente del eyaculado o de tejidos de almacenaje, 2) se puede purificar fácilmente y 3) supuestamente no tiene actividad transcripcional ni traduccional. Los métodos tradicionales para analizar la composición del espermatozoide normalmente se basaban en el uso de anticuerpos o geles en 2D, identificando un número muy limitado de proteínas. Empero, el desarrollo de técnicas de proteómica a partir de EM, ha posibilitado identificar colecciones mucho más amplias de proteínas del espermatozoide y con mayor precisión. Es por ello que durante la última década se han registrado avances prodigiosos en el conocimiento de la composición molecular del espermatozoide (Oliva *et al.*, 2009; Karr y Dorus, 2012; McDonough *et al.*, 2016).

El protocolo estándar de un análisis proteómico basado en ES incluye 1) la extracción de las proteínas de la célula o tejido, 2) la digestión de las proteínas por proteasas, 3) la separación de los péptidos, 4) el análisis de los péptidos en un espectrómetro de masas y 5) la identificación de péptidos y las correspondientes proteínas con base en la información de los espectros (fig. 1). La aplicación de técnicas de alto rendimiento basadas en EM ha permitido caracterizar el proteoma del espermatozoide en diversos organismos modelo como el humano (*Homo sapiens*) (Amaral *et al.*, 2014), el ratón (*Mus musculus*) (Baker, Hetherington, G.M. Reeves, *et al.*, 2008; Dorus *et al.*, 2010; Chauvin *et al.*, 2012), la rata (*Rattus norvegicus*) (Baker, Hetherington, G. Reeves, *et al.*, 2008), el toro (*Bos taurus*) (Peddinti *et al.*, 2008), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Dorus *et al.*, 2006; Wasbrough *et al.*, 2010) o el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Ma *et al.*, 2014). Gracias al avance de la genómica y al gran crecimiento de especies cuyo genoma se ha secuenciado y anotado, en los últimos años también se ha obtenido el proteoma de especies que no son modelo experimental, como por ejemplo el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Skerget *et al.*, 2013), la trucha arcoíris (*rainbow trout*) (Nynca *et al.*, 2014) o la mariposa *Manduca sexta* (Whittington *et al.*, 2015). Estudios recientes han demostrado que una larga proporción del proteoma del espermatozoide se conserva entre especies distantes filogenéticamente (Dorus *et al.*, 2006; Whittington *et al.*, 2015; Bayram *et al.*, 2016). Esta cualidad permitirá llevar a cabo análisis de proteómica comparativa que incluyan organismos no modelo y que a menudo se emplean en estudios ecológicos y evolutivos (ver sección 6).

La caracterización del proteoma completo del espermatozoide se ha complementado, en algunos casos, con estudios donde se han analizado regiones subcelulares, tales como la superficie de la cabeza (Brewis y Gadella, 2010), la matriz acrosomal (Guyonnet *et al.*, 2012) o las estructuras accesorias del flagelo (Cao *et al.*, 2006). Estos análisis regionales han permitido identificar proteínas que, por ser menos abundantes, no se habían encontrado previamente en los estudios del proteoma completo, aportando

colecciones de nuevas proteínas. Además, el fraccionamiento de estructuras subcelulares permite la identificación de proteínas que tienen funciones reproductivas específicas; un ejemplo es la caracterización del proteoma de la superficie del espermatozoide para reconocer proteínas implicadas en la interacción de gametos (Stein *et al.*, 2006; Zigo *et al.*, 2013; Kongmanas *et al.*, 2015). Por otra parte, algunos trabajos se han centrado en analizar las modificaciones post-traduccionales que experimenta el espermatozoide durante la capacitación (Ficarro *et al.*, 2003; Arcelay *et al.*, 2008), así como las proteínas que sufren cambios durante el tránsito del espermatozoide a través del epidídimo (Labas *et al.*, 2015; Skerget *et al.*, 2015).

Una ventaja que presenta la identificación de proteínas con EM respecto de los métodos de transcriptómica es que se asegura la presencia de la proteína en un determinado tejido, lo cual es aún más destacable en el caso del espermatozoide, ya que el testículo es el tejido con mayor actividad transcripcional y la expresión génica durante las espermatogénesis está regulada por mecanismos extremadamente complicados (Chocu *et al.*, 2012; Soumillon *et al.* 2013). La complejidad de los mecanismos de regulación de genes y transcritos durante la espermatogénesis es la causa de que el testículo sea el tejido que presenta la correlación más baja entre los niveles de abundancia de mRNA y proteína (Cagney *et al.*, 2005; Chocu *et al.*, 2012; Vicens *et al.*, 2017). Por esta razón, un estudio adecuado de espermatogénesis debería integrar tanto análisis masivos de expresión génica, como métodos de proteómica.

3. Evolución de las proteínas reproductivas

Desde que Darwin (1871) formulara su teoría sobre la selección sexual, muchos investigadores se han interesado en estudiar la evolución del sexo con el fin de comprender los factores que han generado la amplia diversidad de sistemas reproductivos que se observan en la naturaleza.

Este campo cobró mayor atención cuando se empezaron a caracterizar las primeras proteínas reproductivas y se observó que éstas presentan secuencias muy divergentes entre especies cercanas (Swanson y Vacquier, 2002). Lo anterior constituyó un hallazgo sorprendente, pues debido al papel esencial de la reproducción sexual para la supervivencia de las especies se esperaba que las proteínas reproductivas estuvieran altamente conservadas. Sin embargo, este fenómeno se podía observar desde la perspectiva opuesta: las proteínas reproductivas pueden evolucionar para ser más efectivas y competitivas y, por tanto, contribuyen al mayor éxito reproductivo de los organismos. Su rápida evolución es un patrón recurrente que se ha advertido en grupos tanto de animales como de plantas, así como en diferentes etapas de la reproducción (Swanson y Vacquier, 2002; Clark *et al.*, 2006; Turner y Hoekstra 2008; Karr *et al.*, 2009; Wilburn y Swanson, 2015).

Un método para estimar la tasa evolutiva de una proteína se basa en comparar la secuencia de ADN codificante entre diferentes especies, lo que permite estimar el parámetro dN/dS, también conocido como omega (ω), que es el cociente entre las mutaciones no sinónimas –aquellas que modifican el aminoácido para el que codifica el codon– en sitios no sinónimos (dN) y las mutaciones sinónimas –las que conservan el aminoácido debido a la degeneración del código genético– en sitios sinónimos (dS). A partir del valor ω se puede inferir el perfil evolutivo de la proteína; un valor de $\omega < 1$ indica que la proteína está conservada, ya que la selección ha ido eliminando las mutaciones que alteran los aminoácidos, lo que se conoce como selección negativa o purificante. Un $\omega \sim 1$ se obtiene en genes que han acumulado mutaciones por relajación de la selección y se considera que han evolucionado neutralmente, ejemplo de esto son los pseudogenes que pierden la funcionalidad por la fijación de mutaciones deletéreas. Existen genes que muestran $\omega > 1$, indicando que las mutaciones en la proteína han sido favorecidas por selección, lo que se conoce como selección positiva o evolución adaptativa. Las estimas de ω para una secuencia completa suelen

ser < 1 , ya que la mayor parte de las proteínas están sujetas a fuertes presiones selectivas; también es frecuente que la evolución adaptativa sólo actúe en algunos episodios de la historia evolutiva de la proteína. Por estos motivos, para detectar selección positiva en las proteínas y en los organismos se han desarrollado métodos capaces de estimar ω en codones o linajes específicos (Yang, 2002).

La constante identificación de proteínas reproductivas que experimentan selección positiva llevó a asumir que la mayoría de aquellas implicadas en la reproducción evolucionan rápidamente en respuesta a las fuerzas de selección sexual. No obstante, los avances recientes en los métodos de genómica y proteómica han posibilitado reconocer el repertorio de genes y proteínas que se expresan en tejidos reproductivos como el testículo (Turner *et al.*, 2008), el epidídimo (Dean *et al.*, 2008) o las glándulas accesorias (Dean *et al.*, 2009). Los estudios revelaron que la mayoría de las proteínas expresadas en los tejidos reproductivos se encuentran altamente conservadas, mientras que sólo una pequeña proporción de proteínas presentan señales de selección positiva; además de que las proteínas que muestran tal señal son casi exclusivamente aquellas que se mezclan con los espermatozoides en el eyaculado, como las proteínas del fluido seminal en mamíferos (Clark y Swanson, 2005; Dean *et al.*, 2009), las proteínas seminales accesorias en *Drosophila* (Swanson *et al.*, 2001; Wolfner, 2002; Findlay *et al.*, 2009), o las proteínas secretadas por el epidídimo que se unen a los espermatozoides durante la maduración (Dean *et al.*, 2008).

En el caso del espermatozoide, un primer estudio analizó la evolución de un grupo de proteínas específicas del espermatozoide en mamífero (Torgerson *et al.*, 2002), el cual reveló que muestran una mayor divergencia (medida como dN/dS) que los genes expresados en otros tejidos. Sin embargo, sólo se detectó evidencia de selección positiva para cuatro de los 19 genes analizados. El primer estudio en el que se combinaron análisis de proteómica y evolución molecular se llevó a cabo en el espermatozoide de *Drosophila melanogaster* (Dorus *et al.*, 2006). En este trabajo se detectó que las proteínas del espermatozoide evolucionan con un promedio similar a las de tejidos no

reproductivo, lo que implica que la mayoría se encuentran conservadas y sujetas a selección purificante (fig. 2A); además, no se identificó ninguna proteína del espermatozoide experimentando selección positiva. En un trabajo posterior se reanalizó el proteoma del espermatozoide de *D. melanogaster* empleando herramientas proteómicas más sofisticadas (Wasbrough *et al.*, 2010). Estos exámenes permitieron identificar un catálogo mucho más amplio de proteínas, y gracias a la disponibilidad de un mayor número de genomas secuenciados en especies de *Drosophila*, se realizaron análisis mucho más robustos que volvieron a mostrar que la tasa evolutiva promedio de las proteínas del espermatozoide es significativamente menor que la de proteínas de las glándulas accesorias. Por otra parte, revisiones estadísticas de selección detectaron que sólo 77 genes del espermatozoide (8% del total) presentan evidencia de selección positiva. Tales resultados corroboran que el espermatozoide está sometido a una fuerte selección purificante.

Posteriormente, Dorus *et al.*, se centraron en conocer las fuerzas selectivas que han dirigido la evolución del espermatozoide de mamífero. Para ello, combinaron los catálogos de proteínas que se habían identificado en el espermatozoide de ratón, por estudios proteómicos previos, con una colección propia obtenida a través de análisis de EM/EM (Dorus *et al.*, 2010). En este estudio se determinó la tasa evolutiva de cerca de mil genes mediante análisis interespecíficos, sirviéndose de las secuencias de ratón y otras especies de mamíferos. Se identificó que los genes que codifican para proteínas de la superficie del espermatozoide (incluyendo proteínas de membrana y el acrosoma) evolucionan significativamente más rápido que el resto del proteoma (fig. 2B); además, una mayor proporción de proteínas de la superficie del espermatozoide muestran evidencia de selección positiva. Estos resultados sugieren que diversas fuerzas selectivas, tales como la selección sexual o la respuesta inmune, podrían estar dirigiendo la evolución adaptativa de las proteínas de membrana y el acrosoma, ya que éstas son las proteínas que eventualmente se exponen al ambiente extracelular y a las interacciones con otras células.

Más adelante, Vicens y colaboradores llevamos a cabo un estudio comparativo del proteoma del espermatozoide de ratón. En esta ocasión, se comparó la evolución de diferentes grupos de proteínas que se clasificaron con base en su papel funcional en el espermatozoide (Vicens, Lüke, *et al.*, 2014). Los análisis evolutivos arrojaron que las proteínas del espermatozoide implicadas en la interacción con el óvulo presentan una evolución más acelerada (fig. 2C); además, se observó que el grupo de interacción de gametos registra un mayor porcentaje de proteínas bajo selección positiva respecto de los demás grupos funcionales (fig. 2D). Estos resultados se fundamentan en estudios retrospectivos, en los que se ha identificado selección positiva en diversas proteínas implicadas en la fecundación de mamíferos (Swanson *et al.*, 2003; Turner y Hoekstra 2008a; Vicens, Montoto *et al.*, 2015). Otro grupo que mostró una alta proporción de proteínas bajo selección positiva fue el implicado en la movilidad del espermatozoide. Los anteriores resultados sugieren que la velocidad de nado puede ser un rasgo adaptativo en escenarios de competencia entre machos (ver sección 4) y están soportados por las evidencias previas de que algunas proteínas que regulan la movilidad del espermatozoide presentan cambios adaptativos (Torgerson *et al.*, 2002; Podlaha *et al.*, 2005; Dorus *et al.*, 2010).

Los dos análisis evolutivos sobre el proteoma del espermatozoide de ratón aquí descritos, junto con las evidencias mostradas por estudios retrospectivos, sugieren que las interacciones moleculares que ocurren entre el espermatozoide y el óvulo durante la fecundación podrían ser una diana primaria de las fuerzas de selección sexual. Esto es consistente con lo observado en invertebrados marinos, en los que se ha visto que las proteínas implicadas en el reconocimiento y fusión de gametos evolucionan rápidamente y muestran intensas señales de selección positiva (Vacquier y Swanson, 2011). La rápida divergencia de proteínas del espermatozoide implicadas en la fecundación parece ser resultado de un proceso de coevolución con proteínas de la superficie del óvulo (Clark *et al.*, 2009; Claw *et al.*, 2014; Vicens y Roldan, 2014) y esto podría tener implicaciones en

la compatibilidad gamética y el aislamiento reproductivo (Palumbi, 2009; Vacquier y Swanson, 2011).

Como conclusión diremos que, a pesar de que los primeros estudios que analizaron las pocas proteínas que tenían una función conocida en el espermatozoide encontraron un gran impacto de la selección positiva (Wyckoff *et al.*, 2000; Swanson y Vacquier, 2002; Torgerson *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2006; Turner y Hoekstra, 2008), los resultados obtenidos con el análisis de amplia escala sugieren que sólo una pequeña porción del proteoma de los tejidos reproductivos y el espermatozoide experimenta evolución adaptativa. Además, los focos adaptativos parecen concentrarse en pequeños subgrupos de proteínas que presentan localizaciones y funciones específicas, como por ejemplo las proteínas de la membrana del espermatozoide implicadas en el reconocimiento de gametos. La heterogeneidad evolutiva localizada dentro de los tejidos reproductivos masculinos y el espermatozoide podría ser resultado de una compartimentalización de la adaptación en respuesta a las fuerzas de SSPC, cuyo tema abordaremos en el siguiente apartado.

4. Fuerzas de selección sexual postcópula

Por su función, el espermatozoide y los tejidos reproductivos deben ser un foco de acción de las fuerzas de selección sexual postcópula (SSPC), las cuales implican la competición entre los eyaculados de los machos, un fenómeno conocido como competición espermática (Pizarri y Parker, 2009), así como una selección diferencial del eyaculado por parte de la hembra, que pueden derivar de un conflicto sexual o de una elección críptica de la hembra (Pitnick, Wolfner y Suarez, 2009).

La competición espermática se define como la competencia que ocurre entre los espermatozoides de diferentes machos por fecundar un ovocito (Parker, 1970; Birkhead y Moller, 1998; Pizarri y Parker, 2009). Por tanto, este fenómeno afecta a especies polígamas, en las cuales los ovocitos se

pueden encontrar con el eyaculado de varios machos. La competición espermática ha tenido un papel muy importante en la evolución de los sistemas reproductivos y ha promovido la adquisición y adaptación de numerosos rasgos anatómicos, fisiológicos y comportamentales dirigidos a aumentar la probabilidad de éxito de fecundación de los machos (Dixson y Anderson, 2004; Pizarri y Parker, 2009). Una respuesta primaria a la competición espermática es el incremento del tamaño de los testículos, que tiene como fin aumentar la producción de espermatozoides (Soulsbury, 2010; Ramm *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha observado que dicha competición ha promovido la evolución de diversos rasgos cualitativos del espermatozoide, lo que confiere a los machos de las especies promiscuas una mayor eficiencia de fecundación (Pizarri y Parker, 2009; Fitzpatrick y Lupold, 2014); entre estos rasgos se incluyen la viabilidad, la movilidad, la morfología de la cabeza, las dimensiones de los diferentes componentes del espermatozoide, la eficiencia de desarrollar la capacitación y la reacción acrosomal, mismos que se han correlacionado tanto con la fertilidad como con los niveles de promiscuidad (Hunter y Birkhead, 2002; Gomendio *et al.*, 2006; Gómez Montoto, Magaña, *et al.*, 2011; Gómez Montoto, Varea Sánchez, *et al.*, 2011; Lupold, 2013; Tourmente *et al.*, 2013). La competición espermática da como resultado que los eyaculados de los machos tengan una fecundación más eficiente. Sin embargo, esto en muchas ocasiones no beneficia a las hembras, especialmente cuando el número de espermatozoides que confluye en el tracto femenino es muy elevado, lo que va a provocar un mayor riesgo de que un óvulo se fusione con más de un espermatozoide (polispermia). La polispermia es perjudicial para la hembra, ya que da lugar a embriones no viables que no se desarrollan; por tanto, se genera un escenario en el que las adaptaciones de los machos por incrementar su probabilidad de fecundar en respuesta a la competición espermática van a propiciar adaptaciones en la hembra para reducir la tasa de fecundación. Este fenómeno se conoce como conflicto sexual, ya que los intereses y las adecuaciones de cada sexo para incrementar su fitness

reducen el del sexo opuesto (Hosken y Stockley, 2005; Chapman, 2006). Por otra parte, las hembras pueden imponer mecanismos para que sus ovocitos sean fecundados sólo por los espermatozoides de determinados machos, lo que se conoce como elección críptica (Eberhard, 1996; Gavrillets *et al.*, 2001).

Debido a que el conocimiento de las bases moleculares del conflicto sexual y la elección críptica es limitado en virtud de la dificultad de estudiar las interacciones entre el eyaculado y el tracto reproductivo femenino *in vivo* (*cfr.* Pitnick *et al.*, 2009; McDonough *et al.*, 2016), la mayoría de los estudios tratando de ver las respuestas adaptativas ante la SSPC se han centrado en determinar el papel de la competición espermática en la evolución del eyaculado masculino (Birkhead y Moller, 1998; Pizarri y Parker, 2009).

5. El impacto de la selección sexual en la evolución de los genes reproductivos

De la sección anterior concluimos que las fuerzas de SSPC, y en concreto la competición espermática, juegan un papel importante en la adaptación de los rasgos reproductivos. No obstante, todas las adaptaciones fenotípicas deben ser el resultado de variaciones genéticas que se han fijado por selección positiva; por tanto, se establece que la SSPC va a dirigir primariamente cambios adaptativos en los genes reproductivos. Se han llevado a cabo diferentes aproximaciones para tratar de examinar los efectos de la variación en los sistemas de apareamiento sobre la evolución de los genes reproductivos, que van desde intentos por correlacionar la tasa evolutiva de las secuencias codificantes y reguladoras con la variación en la intensidad de la SSPC, hasta comparar los niveles de expresión de amplias colecciones de genes entre sexos y especies con diferentes sistemas de apareamiento. En las siguientes subsecciones describiremos brevemente cada una de las aproximaciones, comentando los principales hallazgos, así como las limitaciones de cada una de ellas.

5.1 Impacto sobre la evolución de las proteínas reproductivas

Los primeros trabajos que trataron de evaluar los efectos de la SSPC sobre la evolución de las proteínas reproductivas se basaron en la hipótesis de que la tasa evolutiva, o la intensidad de selección positiva, de un gen reproductivo debe incrementarse con los niveles de SSPC, los cuales se miden con un índice comportamental (ej. número de apareamientos por ciclo reproductivo) o anatómico (ej. tamaño relativo de testículos, que es un índice de competición espermática).

Para determinar la asociación entre la evolución de los genes reproductivos y los sistemas de apareamiento se han aplicado principalmente dos metodologías. La primera consiste en realizar un análisis de regresión lineal entre la tasa evolutiva (ω) estimada para las ramas de una filogenia con un índice continuo de SSPC (fig. 3A); de este modo, la obtención de correlaciones significativas quiere decir que la proteína en cuestión evoluciona en respuesta a la selección sexual. Usando esta metodología, Dorus y colaboradores mostraron que la tasa evolutiva de la semenogelina 2 (SEMG2), que es el principal componente del fluido seminal y en la formación del coágulo seminífero en primates, se correlaciona positivamente con los niveles de competición espermática (Dorus *et al.*, 2004). Además, ellos observaron que la tasa evolutiva de SEMG2 se relaciona con la tasa de coagulación del semen en diferentes especies de primates. Este trabajo representó la primera evidencia de una proteína reproductiva evolucionando bajo la influencia de la SSPC, además de demostrar el efecto de esta evolución a nivel fenotípico. Herlyn y Zischler (2007) analizaron la evolución molecular del gen *zan* que codifica para la zonadhesina, una proteína implicada en el reconocimiento gamético y en la fecundación; encontraron una correlación negativa entre ω y el nivel de dimorfismo sexual, que se interpreta como un índice inverso de competición espermática. Recientemente, Vicens y colaboradores examinamos la evolución molecular de PKDREJ, una proteína que participa en el transporte y la

reacción acrosomal, y encontramos una correlación positiva entre la tasa evolutiva y el tamaño relativo de testículo en especies de roedores (Vicens, Montoto, *et al.*, 2015). Es posible que la SSPC no sólo dirija cambios en la composición de aminoácidos, sino que también podría favorecer la fijación de inserciones y deleciones. El potencial adaptativo de estos cambios se planteó tras observar que el tamaño de una proteína del fluido seminal (SVS II) y otra del espermatozoide (catsper1) se correlacionan significativamente con los niveles de competición espermática (Ramm *et al.*, 2009; Vicens, Tourmente, *et al.*, 2014).

Aunque la primera hipótesis implicaba que la tasa evolutiva de una proteína reproductiva debe correlacionarse positivamente con los niveles de competición espermática, Lüke, Vicens y colaboradores encontramos una correlación inversa entre la tasa evolutiva del precursor de la protamina 2 (PRM2) y el tamaño relativo de testículo en roedores (Lüke *et al.*, 2011). Dado que PRM2 está codificada por un gen duplicado de PRM1, que es la protamina principal encargada de compactar la cromatina durante la espermiogénesis, el gen PRM2 podría presentar una función redundante y estar sujeto a relajación funcional. Un estudio posterior reveló que una mayor conservación de PRM2 se correlaciona con una mayor elongación de la cabeza del espermatozoide, un rasgo que lo hace más veloz y por tanto más competitivo (Lüke *et al.*, 2014). A partir de estos hallazgos se ha sugerido que la selección sexual puede actuar conservando copias de genes específicos del espermatozoide para potenciar algunas funciones.

La segunda aproximación se centra en determinar si existe mayor intensidad de selección positiva en aquellos linajes con mayor SSPC. En este método se clasifican las ramas de una filogenia en dos categorías, en función de su valor del índice de SSPC (fig. 3B). A esta filogenia se le aplican diferentes modelos evolutivos de máxima verosimilitud, para evaluar si existe selección positiva en las ramas correspondientes a los linajes de alta SSPC respecto de las de baja (para una descripción más detallada del método, ver Ramm *et al.*, 2008). Ramm y colaboradores encontraron

evidencia de selección positiva en cinco de siete proteínas implicadas en la reproducción en roedores. De estas cinco, sólo SVS2 –que es un componente del fluido seminal involucrado en la formación del tapón copulatorio– mostró selección positiva en los linajes de mayor competición espermática empleando la metodología mencionada. Finn y Civetta (2010) analizaron la evolución de la familia de proteínas de membrana ADAMs que participan en la interacción con otras células o componentes extracelulares y encontraron señal de selección positiva concentrada en las especies de primates más poliándricas para tres ADAM expresadas en la superficie del espermatozoide. En el trabajo citado en el párrafo anterior de Vicens y colaboradores (Vicens, Montoto, *et al.*, 2014) también se detectó evidencia de selección positiva en PKDREJ para las especies de roedores con mayores niveles de competición espermática.

En la tabla 1 se concentran todas las proteínas en las que se ha identificado un efecto de la SSPC. A pesar de que se ha analizado la evolución de numerosos genes reproductivos, han sido muy pocos en los que se ha encontrado una asociación significativa entre su tasa evolutiva (o su señal de selección positiva) y los niveles de SSPC. La dificultad para determinar el impacto molecular de la SSPC por estas metodologías se ha atribuido a cuatro posibles (y no excluyentes) factores: 1) los rasgos reproductivos normalmente están regulados por múltiples genes con efectos aditivos, 2) las fuerzas de selección sexual pueden actuar sobre diferentes genes en distintas especies, 3) otras fuerzas selectivas no relacionadas con el sexo (ej. respuestas inmunológicas en el tracto femenino) pueden dirigir la evolución de genes reproductivos y 4) los métodos para detectar covarianzas entre la tasa evolutiva de una proteína reproductiva y los sistemas de apareamiento presentan limitaciones importantes (Wong, 2011). Las dos primeras limitaciones pueden resolverse llevando a cabo análisis masivos que determinen la evolución de amplios catálogos de genes y proteínas entre especies con diferente sistema de apareamiento, como veremos a continuación.

5.2 Impacto sobre la evolución de la expresión de los genes reproductivos

Las adaptaciones fenotípicas pueden ser resultado de cambios en la secuencia codificante de los genes; no obstante, las modificaciones en la regulación de la expresión génica pueden tener un efecto más importante en los cambios adaptativos, ya que las secuencias reguladoras y los niveles de expresión son más lábiles y presentan menos restricciones funcionales que las secuencias codificantes. Mientras que en la mayoría de los estudios en la pasada década se examinó la evolución estructural de las proteínas reproductivas, muy pocos trabajos se interesaron en evaluar los efectos fenotípicos de los cambios en las regiones reguladoras y los niveles de expresión de los genes reproductivos. Esto se ha debido principalmente a la mayor dificultad de identificar los elementos reguladores y a las limitaciones de los modelos que determinan el modo de evolución de la expresión génica (Gilad *et al.*, 2006). No obstante, existen evidencias de que mutaciones adaptativas en los elementos reguladores pueden causar cambios en los niveles de expresión de los genes y que tal variación tiene la capacidad de generar modificaciones en rasgos fenotípicos (Sucena y Stern, 2000; Shapiro *et al.*, 2004; Rockman *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que los genes con expresión sesgada entre los sexos son altamente divergentes, tanto a nivel de estructura como de expresión (Ellegren y Parsch, 2007). Por otra parte, un estudio de Brawand y colaboradores analizó la evolución de la expresión génica en diversos tejidos de mamíferos, evidenciando que en testículo ha sido mucho más rápida que en los tejidos somáticos (Brawand *et al.*, 2011). Estas características han llevado a plantear que la rápida evolución de los genes con expresión restringida a los sexos masculino o femenino son producto de la selección sexual, aunque esto no se ha evaluado hasta recientemente. En un primer intento de determinar si la SSPC influye en la evolución de la expresión de los genes reproductivos masculinos, Martín-Coello y colaboradores (2009) compararon la secuencia reguladora de los genes que codifican para las

protaminas entre especies de roedores con diferentes niveles de competición espermática. Ellos encontraron que la divergencia del promotor de PRM2 se correlaciona positivamente con los niveles de competición espermática. Posteriormente, Lüke y colaboradores (2014) detectaron una asociación negativa entre los niveles de transcripción de PRM2 y la elongación de la cabeza. Dado que una cabeza más elongada incrementa la velocidad de nado de los espermatozoides, es posible que la SSPC favorezca una menor expresión de PRM2 en las especies más promiscuas para generar espermatozoides más veloces y competitivos. Esto sugiere que las fuerzas de SSPC podrían dirigir cambios reguladores en la expresión de los genes reproductivos.

En un estudio reciente de Harrison y colaboradores (2015) se comparó la evolución del transcriptoma entre especies de aves con diferentes niveles de selección sexual, el cual reveló que los índices de SSPC predicen la proporción de genes que tienen una expresión restringida a los machos, fenómeno que no se observa en las hembras. En este estudio también se observó que los genes restringidos a machos presentan una mayor divergencia de sus secuencias codificantes. Sin embargo, no se encontró una asociación entre la tasa evolutiva de las secuencias codificantes con los niveles de selección sexual. Estos resultados sugieren que la selección sexual tiene, al menos a corto plazo, una mayor influencia sobre la evolución de la expresión de los genes que sobre la divergencia de las secuencias codificantes.

Se han propuesto varias fuerzas y mecanismos que podrían contribuir a la expresión sesgada de genes entre los sexos (Parsch y Ellegren, 2013). En el caso de los genes sesgados a los machos, un mecanismo propuesto y del cual se tiene cada vez más evidencias, es la adquisición de una expresión específica o enriquecida en el testículo de una nueva copia de un gen originada por un evento de duplicación en tándem o retroduplicación (Karr y Dorus, 2012; Parsch y Ellegren, 2013). Ésta puede ser la causa principal de que la evolución de la expresión en testículos sea mucho más rápida que en tejidos somáticos (Brawand *et al.*, 2011). La adquisición de expresión de genes en el testículo puede dar lugar a la ganancia de nuevas proteínas

y funciones en el espermatozoide, como se ha observado previamente en algunos estudios (Dorus *et al.*, 2008; Dorus *et al.*, 2011).

6. La proteómica comparativa como herramienta para estudiar el impacto de la selección sexual en el espermatozoide

Como dijimos en las secciones anteriores, las fuerzas de SSPC han tenido un fuerte impacto en la evolución de la expresión génica en los machos (ver subsección 5.2). Aunque el transcriptoma del testículo parece ser un foco de acción de la selección sexual, la evolución de la expresión génica en este tejido podría no mostrar una correlación clara con la diversificación del espermatozoide, dada la alta complejidad de los procesos de regulación que ocurren en la espermatogénesis (ver sección 2).

Los análisis proteómicos parecen ser, por tanto, una herramienta adecuada para asociar los cambios de expresión génica del testículo con la diversificación fenotípica del espermatozoide. A pesar de la amplia colección de estudios que ha caracterizado la composición del espermatozoide en diversas especies (ver sección 2), hasta recientemente no se han podido evaluar las bases moleculares de la diversificación del gameto masculino. Esto se ha debido principalmente a la carencia de herramientas cuantitativas que permitan comparar el proteoma de especies con diferentes sistemas de apareamiento. En un estudio actual llevado a cabo por Vicens y colaboradores, aplicamos por primera vez herramientas de proteómica cuantitativa para comparar el proteoma del espermatozoide entre tres especies de roedores con diferentes niveles de competición espermática (*Mus musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) (Vicens *et al.*, 2017). En este trabajo se compararon cuantitativamente más de mil proteínas y se exploraron aquellas del espermatozoide que muestran patrones de divergencia correlacionados con cambios

en la intensidad de competición espermática mediante análisis de clustering (fig. 4A). Exámenes de ontología sobre las proteínas de cada clúster revelaron grupos subcelulares y funcionales que responden a la variación en la competición espermática; un hallazgo interesante fue el enriquecimiento de proteínas acrosomales y del complejo receptor de la zona pelúcida dentro del clúster 2 (fig. 4B), indicando que la especie que experimentó una relajación de la selección sexual desde el ancestro común (*M. musculus*) redujo la expresión de proteínas implicadas en el reconocimiento e interacción con la zona pelúcida. Esto podría justificar las asimetrías en fecundación que se observaron previamente entre estas especies (Martin-Coello *et al.*, 2009). Respecto del flagelo, se percibió un enriquecimiento de proteínas que componen el armazón de dineínas y el aparato central del axonema, así como un grupo de proteínas que contribuyen a la actividad motriz de los microtúbulos, en los clústers 1 y 2, correlacionados positivamente con los niveles de competición espermática (fig. 4B). Por otra parte, en los clústers 3 y 4, que corresponden a una disminución de la abundancia en especies de mayor competición espermática, se registró una alta representación de proteínas implicadas en glicolisis (fig. 4C). Esta observación reflejaría la menor dependencia que tienen las especies *M. spretus* y *M. spicilegus* de esta ruta metabólica para la producción de ATP (Tourmente *et al.*, 2015).

Por tanto, nuestros análisis de proteómica comparativa sugieren que algunos grupos de proteínas podrían alterar su nivel de abundancia en el espermatozoide como respuesta primaria a un aumento o reducción de la competición espermática. No obstante, queremos ser cautos a la hora de interpretar nuestros resultados, ya que sólo trabajamos con tres especies. Además, se debe tener en cuenta que la competición espermática probablemente no es la única fuerza que provoca la variación proteómica observada y que otros procesos neutrales o selectivos deben ser considerados para comprender mejor la diversificación molecular del espermatozoide.

7. Futuras perspectivas

Los avances en las herramientas de genómica y proteómica logrados durante la última década han permitido ampliar el conocimiento sobre la composición molecular de los diferentes tejidos reproductivos y del espermatozoide. Empero, el estudio de las fuerzas y mecanismos que dirigen la evolución de los genes reproductivos todavía se encuentra en una etapa temprana. Las primeras indagaciones que integran métodos masivos con análisis de genómica comparativa y evolución molecular han permitido conocer el impacto de la selección positiva sobre el proteoma de tejidos reproductivos y el espermatozoide; sin embargo, la evolución adaptativa de los genes reproductivos parece ser resultado de fuerzas selectivas heterogéneas y entre éstas el grado de aportación de la selección sexual aún no se ha determinado. Por tanto, para evaluar rigurosamente el impacto de las fuerzas de SSPC sobre la evolución de sistemas reproductivos y los gametos se requieren aproximaciones que comparen catálogos amplios de genes o proteínas entre especies filogenéticamente próximas que abarquen un rango de sistemas de apareamiento. Empero, siempre se debe tener en cuenta que pueden existir fuerzas selectivas más prominentes que la selección sexual y otras funciones pueden ser el resultado de la evolución adaptativa de los genes reproductivos como, por ejemplo, la respuesta inmune.

Por otro lado, la inmensa mayoría de estudios que han analizado el papel de la selección sexual en rasgos reproductivos se han centrado únicamente en componentes masculinos, dejando de lado los femeninos. Futuros análisis evolutivos y funcionales de los sistemas reproductivos deberán tener en cuenta la interacción y el conflicto entre los dos sexos; es decir, para tener un conocimiento más preciso sobre la influencia de las fuerzas de SSPC se deberá estudiar conjuntamente el espermatozoide con elementos del tracto reproductivo femenino (TRF). Considerar las interacciones entre los componentes masculinos y femeninos también será necesario para comprender cómo coevolucionan los sistemas reproductivos.

Aunque tradicionalmente se han utilizado aproximaciones de genética inversa para investigar las bases moleculares de los rasgos reproductivos adaptativos, las herramientas de genética directa pueden ser muy valiosas para identificar genes asociados con diferencias en el éxito reproductivo. Un buen ejemplo es el reciente trabajo de Fisher y colaboradores (2016), quienes identificaron que la variación del locus PRKAR1A predice diferencias en la longitud de la pieza media del espermatozoide y la eficiencia de fecundación.

Tabla 1. Lista de proteínas reproductivas masculinas que han evolucionado en respuesta a la selección sexual postcópula.

Proteína	Parámetro molecular	Índice de selección sexual	Método comparativo ^a	Especies	Referencia
SEMG2	Omega	Tamaño relativo de testículos. Número de parejas por ciclo reproductivo. Tasa de coagulación seminífera.	Cor	Primates	Dorus <i>et al.</i> , 2004. PKDREJ
SVS-II	Omega Masa molecular	Tamaño relativo de testículos.	Cat	Roedores	Ramm <i>et al.</i> , 2008; Ramm <i>et al.</i> , 2009.
PRM2	Omega	Tamaño relativo de testículos.	Cor	Roedores	Martín-Coello <i>et al.</i> , 2009; Lüke <i>et al.</i> , 2011.
ZAN	Omega	Dimorfismo sexual.	Cor	Primates	Herlyn y Zischler, 2007.
CATSPER1	Tamaño de la región N-terminal	Tamaño relativo de testículo. Movilidad espermática.	Cor	Roedores	Vicens, Tourmente, <i>et al.</i> , 2014.
PKDREJ	Omega	Tamaño relativo de testículo.	Cor, Cat	Roedores	Vicens, Montoto, <i>et al.</i> , 2014.

^aMétodo comparativo para evaluar la asociación de evolución de genes con sistemas de apareamiento: correlación tasa evolutiva (Cor), clasificación de ramas por categorías en términos del nivel de selección sexual (Cat).

Figura 1. Protocolo de extracción e identificación de proteínas del espermatozoide. El paso inicial es aislar los espermatozoides de su medio (puede ser del eyaculado o del tejido de almacenaje, dependiendo el organismo); se extraen las proteínas de las células totales o de compartimentos subcelulares, para lo que hay que realizar un fraccionamiento subcelular previo. Las proteínas extraídas normalmente se separan en geles de poliacrilamida (PAGE), mediante el uso de geles 1D (1D-PAGE) o 2D (2D-PAGE). Las proteínas se escinden de los geles y se digieren (regularmente con tripsina) para generar los péptidos, que se separan (comúnmente por cromatografía líquida) y se analizan por espectrometría de masas. Los datos de espectrometría finalmente son identificados con proteínas mediante algoritmos de búsqueda en bases de datos. Figura basada en el esquema Amaral *et al.*, 2014. Imágenes tomadas de Van der Velden *et al.* 2011 (gel 1D), Wikimedia Commons (gel 2D), Wikipedia (Espectrómetro), Separation Science (espectros) y Findlay & Swanson, 2010 (identificación de proteínas).

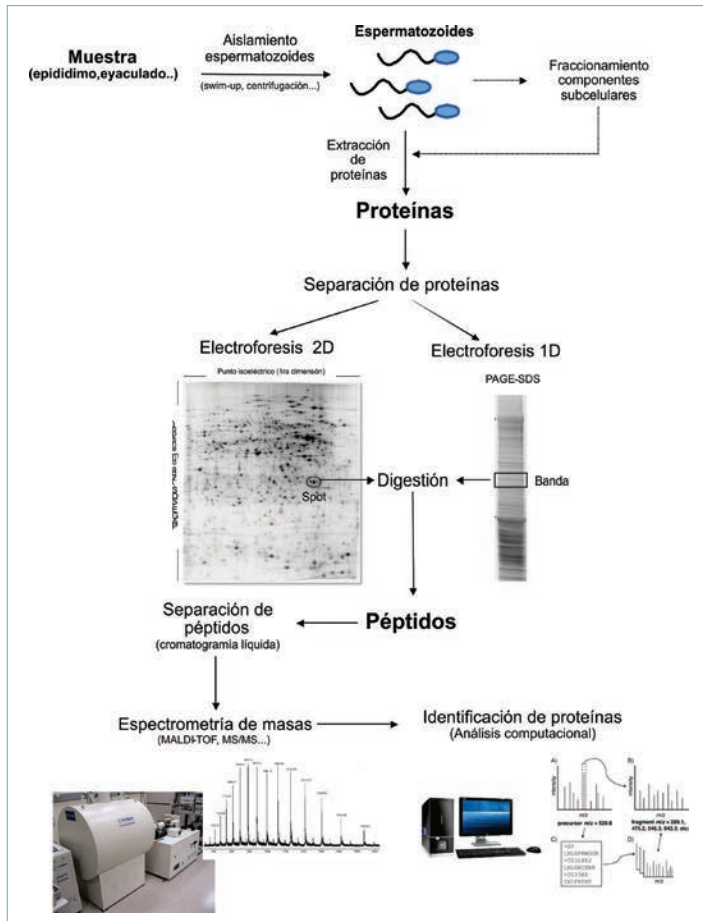


Figura 2. Evolución del proteoma del espermatozoide en diferentes especies.

A) Estimación de la tasa evolutiva promedio del proteoma del espermatozoide de *Drosophila Melanogaster* y su comparación con proteínas no reproductivas, proteoma de las glándulas accesorias y proteínas accesorias (ACPs). En la parte inferior se muestran las comparaciones estadísticas respecto del proteoma del espermatozoide y de las glándulas accesorias. NS: no significativa, ++: $p < 0.01$. Modificada de Dorus *et al.*, 2006. **B)** Estimación de las tasas evolutivas de los diferentes componentes subcelulares del espermatozoide de ratón. Se muestran las estimas promedio para el proteoma completo del espermatozoide, las proteínas de membrana y el flagelo. Las tasas evolutivas se calcularon para ratón mediante comparación con ortólogos de otros mamíferos; se muestran diferencias significativas entre proteínas de membrana y el resto del proteoma (* $p < 0.01$). Modificada de Dorus *et al.*, 2010. **C)** Tasa evolutiva promedio de genes clasificados en diferentes categorías funcionales del espermatozoide. **D)** Proporción de genes sujetos a selección positiva en las diferentes categorías funcionales. SMG: espermatogénesis; MET: metabolismo; MOT: movilidad; CAP: capacitación; AR: reacción acrosomal; SEI: interacción espermatozoide-óvulo. Modificada de Vicens *et al.*, 2014.

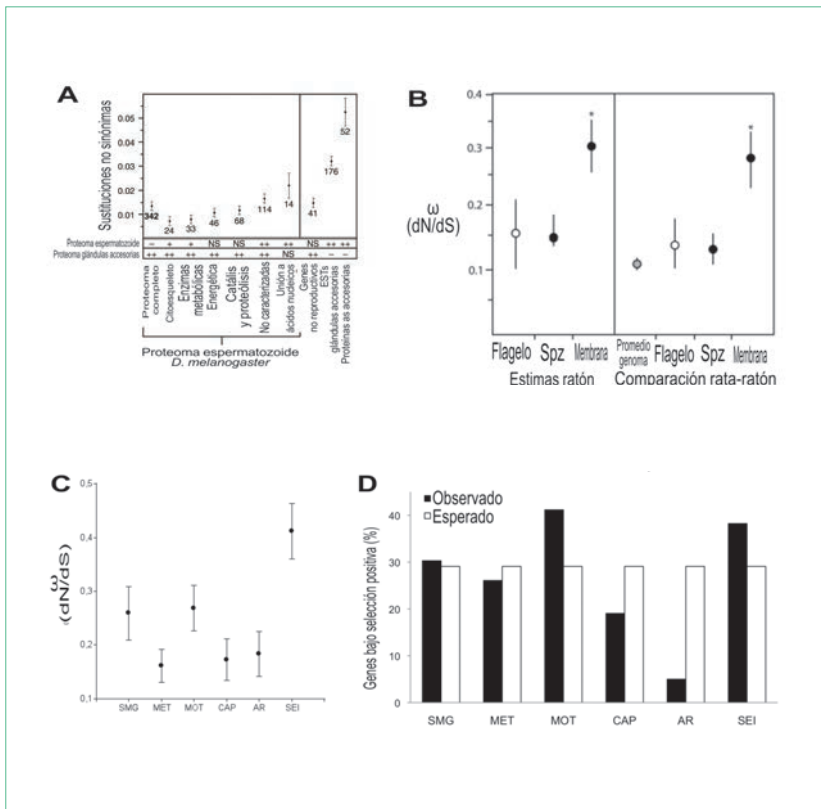


Figura 3. Métodos comparativos para identificar genes reproductivos bajo la influencia de la selección sexual postcópula (SSPC). **A)** Estimación de tasas evolutivas (ω) en las ramas terminales de una filogenia y correlación de ω con un índice de SSPC como, por ejemplo, el tamaño relativo de testículo. La longitud de las ramas es proporcional a las tasas evolutivas. **B)** División de las ramas entre linajes con alta SSPC (ejemplo: especies poliándricas) o baja SSPC (ejemplo: especies monógamas). Modelos evolutivos de máxima verosimilitud que asumen selección purificante sobre todas las ramas ($\omega \leq 1$, nulo) con modelos que tienen en cuenta selección positiva en las ramas de alta SSPC ($\omega > 1$, alternativo) son comparados estadísticamente. Figura basada en Wong, 2011.

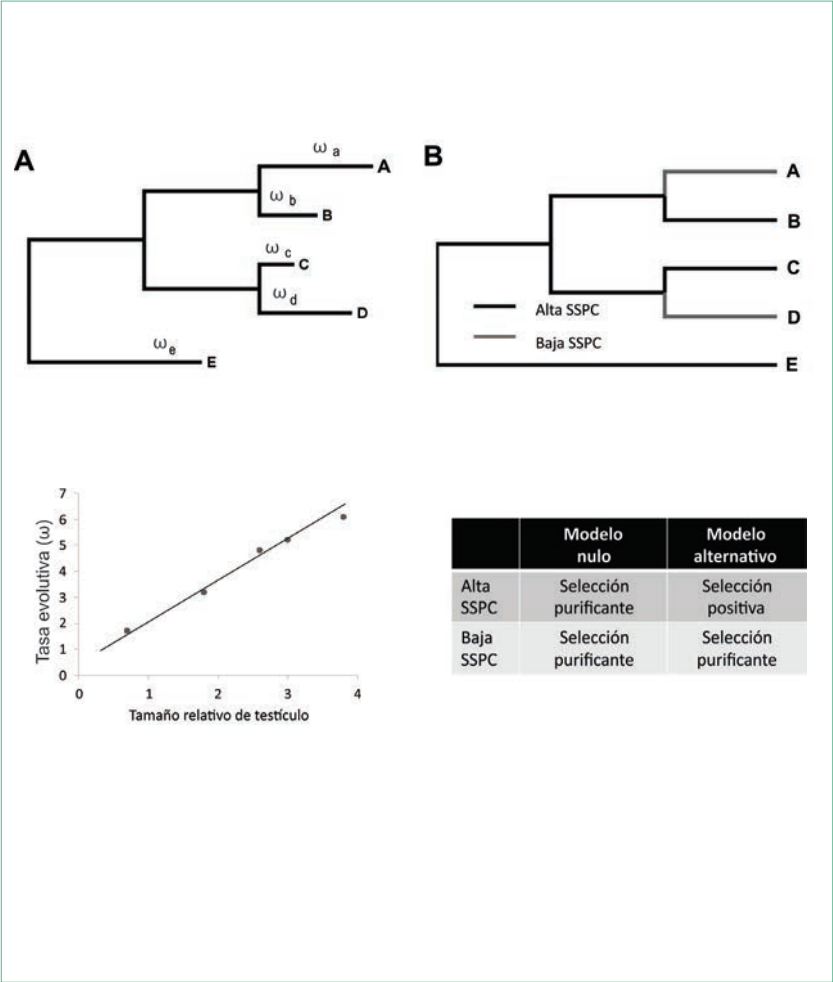
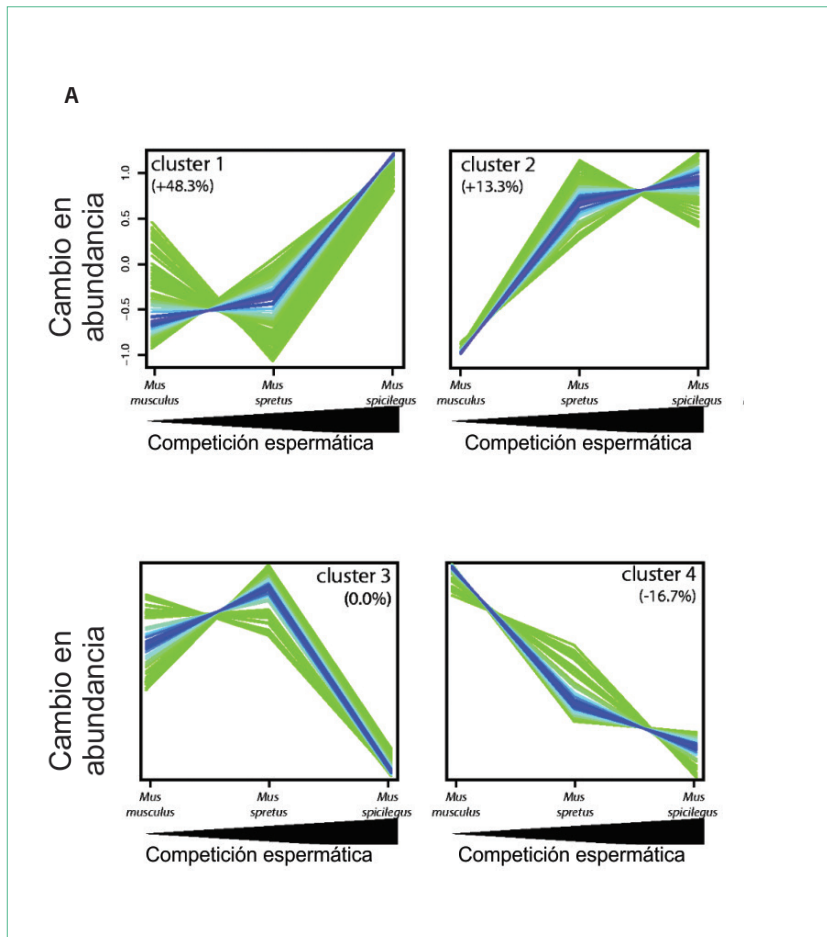
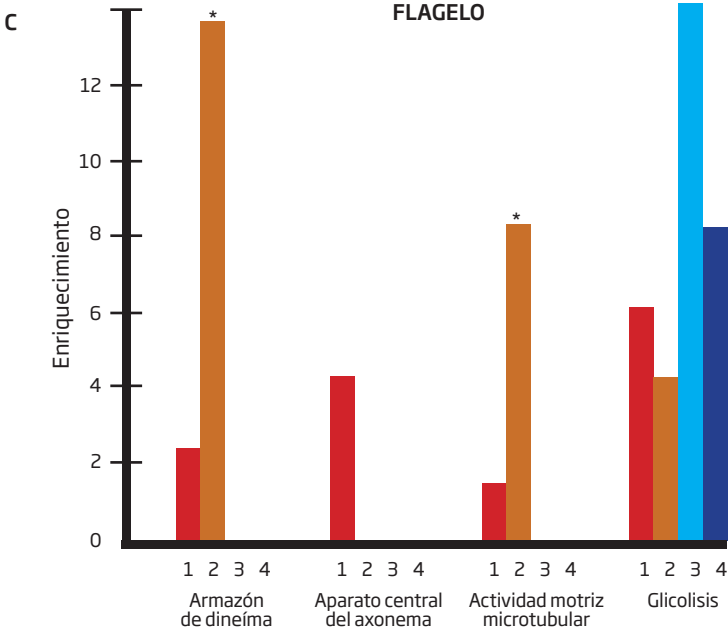
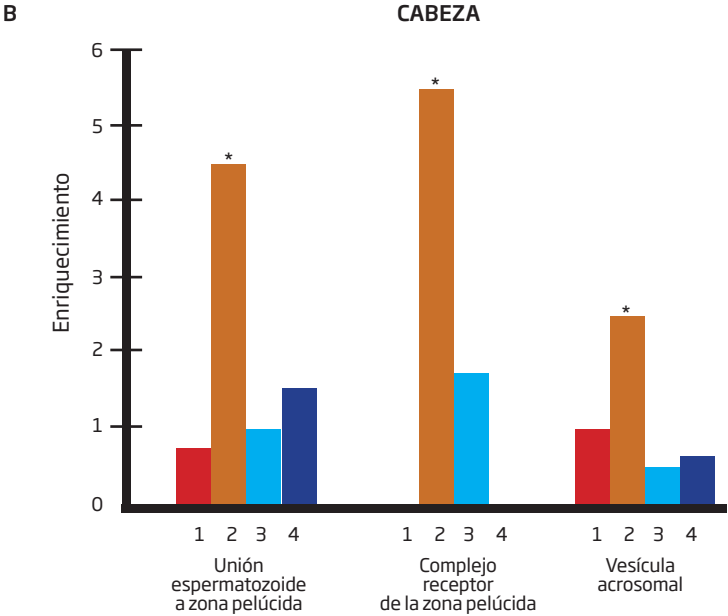


Figura 4. Diversidad del proteoma del espermatozoide asociada con la intensidad de competición espermática. A) Análisis de *clustering* identificaron patrones de divergencia asociados con los niveles de competición espermática, estimada con la diferencia en el tamaño relativo de testículos. La significancia de pertenencia de las proteínas a cada clúster se indica mediante colores (morado: mayor probabilidad; verde: menor probabilidad), así como el porcentaje de desviación en la cantidad de proteínas asociadas a cada clúster respecto de la esperada desde una distribución uniforme (60 proteínas por clúster). **B-C)** Enriquecimiento de proteínas pertenecientes a diferentes grupos funcionales relacionados con la cabeza (**B**) y el flagelo (**C**) Diferencias significativas entre clústers se señalan con asteriscos. Los valores de enriquecimiento se estimaron con base en la frecuencia de proteínas esperada, dentro de categoría del proteoma del espermatozoide. Figuras tomadas y modificadas de Vicens *et al.*, 2017.





Referencias

- Amaral A., Castillo J., Ramalho-Santos J. y Oliva R. (2014). The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum. Reprod. Update*, 20, 40-62.
- Arcelay E., Salicioni A.M., Wertheimer E. y Visconti P.E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int. J. Dev. Biol.*, 472, 463-472.
- Baker M.A., Hetherington L., Reeves G., Müller J. y Aitken R.J. (2008). The rat sperm proteome characterized via 1PG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics*, 8, 2312-2321.
- Baker M.A., Hetherington L., Reeves G.M. y Aitken R.J. (2008). The mouse sperm proteome characterized via 1PG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics*, 8, 1720-1730.
- Bayram H.L., Claydon A.J., Brownridge P.J., Hurst J.L., Mileham, A., Stockley P., Beynon R.J. y Hammond, D.E. (2016). Cross-species proteomics in analysis of mammalian sperm proteins. *J. Proteomics*, 135, 38-50.
- Birkhead T.R., Hosken, D.J. y Pitnick, S. (2008). *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Oxford: Academic Press.
- Birkhead, T.R. y Moller, A.P. (1998). *Sperm Competition and Sexual Selection*. San Diego, CA: Academic Press.
- Birkhead, T.R. y Pizzari, T. (2002). Postcopulatory sexual selection. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 262-273.
- Brawand, D., Soumillon, M., Necsulea, A., Julien, P., Csardi, G., Harrigan, P., Weier, M., Liechti, A., Aximu-Petri A, Kircher M, *et al.* (2011). The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature*, 478, 343-348.
- Brewis I.A. y Gadella, B.M. (2010). Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol. Hum. Repr.*, 16, 68-79.
- Cagney, G., Park, S., Chung, C., Tong, B., O'Dushlaine, C., Shields, D.C. y Emili, A. (2005). Human tissue profiling with multidimensional protein identification technology. *J. Proteome Res*, 4, 1757-1767.
- Cao, W., Gerton, G.L. y Moss, S.B. (2006). Proteomic Profiling of Accessory Structures from the Mouse Sperm Flagellum. *Mol Cell Proteomics*, 5, 801-810.
- Chapman, T. (2006). Evolutionary Conflicts of Interest between Males and Females. *Curr. Biol.*, 16, 744-754.
- Chauvin, T., Xie, F., Liu, T., Nicora, C.D., Yang, F., Camp, D.G., Smith, R.D. y Roberts, K.P. (2012). A systematic analysis of a deep mouse epididymal sperm proteome. *Biol. Reprod.*, 87(6), 1-8.
- Chocu, S., Calvel, P., Rolland, A.D. y Pineau, C. (2012). Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 58, 179-190.

- Clark, N.L., Aagaard, J.E. y Swanson, W.J. (2006). Evolution of reproductive proteins from animals and plants. *Reproduction*, 131, 11-22.
- Clark, N.L., Gasper, J., Sekino, M., Springer, S.A., Aquadro, C.F. y Swanson, W.J. (2009). Coevolution of interacting fertilization proteins. *PLoS Genet.*, 5, e1000570.
- Clark, N.L. y Swanson, W.J. (2005). Pervasive Adaptive Evolution in Primate Seminal Proteins. *PLoS Genet.*, 1(3), e35.
- Claw, K.G., George, R.D. y Swanson, W.J. (2014). Detecting coevolution in mammalian sperm-egg fusion proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 81, 531-538.
- Darwin, C. (1871). *The Descent of Man, and selection in relation to sex*. London: Albemarle.
- Dean, M.D., Clark, N.L., Findlay, G.D., Karn, R.C., Yi, X., Swanson, W.J., MacCoss, M.J. y Nachman, M.W. (2009). Proteomics and comparative genomic investigations reveal heterogeneity in evolutionary rate of male reproductive proteins in mice (*Mus domesticus*). *Mol. Biol. Evol.*, 26, 1733-1743.
- Dean, M.D., Good, J.M. y Nachman, M.W. (2008). Adaptive evolution of proteins secreted during sperm maturation: an analysis of the mouse epididymal transcriptome. *Mol. Biol. Evol.*, 25, pp. 383-392.
- Dixson, A.F. y Anderson, M.J. (2004). Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiol Behav.*, 83, 361-371.
- Dorus, S., Evans, P.D., Wyckoff, G.J., Choi, S.S. y Lahn, B.T. (2004). Rate of molecular evolution of the seminal protein gene *SEMG2* correlates with levels of female promiscuity. *Nat Genet*, 36, 1326-1329.
- Dorus, S., Busby, S.A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. y Karr, T.L. (2006). Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat Genet*, 38, 1440-1445.
- Dorus, S., Freeman, Z.N., Parker, E.R., Heath, B.D. y Karr, T.L. (2008). Recent Origins of Sperm Genes in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*, 25, 2157-2166.
- Dorus, S., Wasbrough, E.R., Busby, J., Wilkin, E.C. y Karr, T.L. (2010). Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Mol Biol Evol* 27, 1235-1246.
- Dorus, S., Wilkin, E.C. y Karr, T.L. (2011). Expansion and functional diversification of a leucyl aminopeptidase family that encodes the major protein constituents of *Drosophila* sperm. *BMC Genomics*, 12. doi: 10.1186/1471-2164-12-177
- Eberhard, W.G. (1996). *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton: Princeton.
- Ellegren, H. y Parsch, J. (2007). The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat. Rev. Genet.*, 8, 689-698.
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., et al. (2003). Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. *Biochemistry*, 278, 11579-11589.
- Findlay, G.D., MacCoss, M.J. y Swanson, W.J. (2009). Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in *Drosophila*. *Genome Res.* 19, 886-896.
- Finn, S. y Civetta, A. (2010). Sexual selection and the molecular evolution of ADAM proteins. *J Mol Biol.*, 71, 231-240.

- Fisher, H.S., Jacobs-Palmer, E., Lassance, J.-M. y Hoekstra, H.E. (2016). The genetic basis and fitness consequences of sperm midpiece size in deer mice. *Nat. Commun.*, 7.
- Fitzpatrick, J.L. y Lupold, S. (2014). Sexual selection and the evolution of sperm quality. *Mol. Hum. Reprod.*, 20, 1180-1189.
- Gavrilets, S., Arnqvist, G. y Friberg, U. (2001). The evolution of female mate choice by sexual conflict. *Proc. Bio. Sci.*, 7, 531-539.
- Gilad, Y., Oshlack, A. y Rifkin, S.A. (2006). Natural selection on gene expression. *Trends. Genet.*, 22, 456-461.
- Gomendio, M., Martín-Coello, J., Crespo, C., Magaña, C. y Roldán E., R.S. (2006). Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *P Natl Acad Sci USA*, 103, 15113-15117.
- Gómez Montoto, L., Magaña, C., Tourmente, M., Martín-Coello, J., Crespo, C., Luque-Larena, J.J., Gomendio, M. y Roldán E., R.S. (2011). Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in muroid rodents. *PLoS one*, 6, e18173.
- Gómez Montoto, L., Varea Sánchez, M., Tourmente, M., Martín-Coello, J., Luque-Larena, J.J., Gomendio, M. y Roldán E., R.S. (2011). Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents: head first. *Reproduction*, 142, 819-830.
- Guyonnet, B., Zabet-Moghaddam, M., SanFrancisco, S., Cornwall, G.A. (2012). Isolation and proteomic characterization of the mouse sperm acrosomal matrix. *Mol. Cell. Proteomics*, 11, 758-774.
- Harrison, P.W., Wright, A.E., Zimmer, F., Dean, R., Montgomery, S.H., Pointer, M.A. y Mank, J.E. (2015). Sexual selection drives evolution and rapid turnover of male gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 4393-4398.
- Herlyn, H. y Zischler, H. (2007). Sequence evolution of the sperm ligand zonadhesin correlates negatively with body weight dimorphism in primates. *Evolution*, 61, 289-298.
- Hosken, D.J. y Stockley, P. (2005). Sexual conflict. *Curr. Biol.*, 15, 535-536.
- Hunter, F.M. y Birkhead, T.R. (2002). Sperm viability and sperm competition in insects. *Curr. Biol.*, 12, 121-123.
- Karr, T.L. y Dorus, S. (2012). Evolutionary genomics of the sperm proteome. En R.S. Singh, J. Xu y R.J. Kulathinal (eds.), *Evolution in the fast lane: Rapidly evolving genes and genetic systems* (pp. 153-164). Oxford: Oxford University Press.
- Karr, T.L., Swanson, W.J. y Snook, R.R. (2009). The evolutionary significance of variation in sperm-egg interactions. En T.R. Birkhead, D.J. Hosken y S. Pitnick (eds.), *Sperm biology: an Evolutionary Perspective* (pp. 305-365). London: Academic press.
- Kongmanas, K., Kruevaisayawan, H., Saewu, A., Sugeng, C., Fernandes, J., Souda, P., Angel, J.B., Faull, K.F., Aitken, R.J., Whitelegge, J., et al. (2015). Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. *J. Cell. Physiol.*, 230, 449-463.
- Labas, V., Spina, L., Belleanne, C., Teixeira-Gomes, A.-P., Gargaros, A., Dacheux, F. y Dacheux, J.-L. (2015). Analysis of epididymal sperm maturation by MALDI profiling and top-down mass spectrometry. *J. Proteomics*, 113, 226-243.
- Lüke, L., Vicens, A., Serra, F., Luque-Larena, J.J., Dopazo, H., Roldán E., R.S. y Gomendio, M. (2011). Sexual Selection Halts the Relaxation of Protamine 2 among Rodents. *PLoS one*, 6, e29247.

- Lüke, L., Vicens, A., Tourmente, M. y Roldán E., R.S. (2014). Evolution of Protamine Genes and Changes in Sperm Head Phenotype in Rodents. *Biol. Reprod.*, 90, 258-270.
- Lupold, S. (2013). Ejaculate quality and constraints in relation to sperm competition levels among eutherian mammals. *Evolution*, 67, 3052-3060.
- Ma, X., Zhu, Y., Li, C., Xue, P., Zhao, Y., Chen, S., Yang, F. y Miao, L. (2014). Characterisation of *Caenorhabditis elegans* sperm transcriptome and proteome. *BMC Genomics*, 15. doi: 10.1186/1471-2164-15-168.
- Martín-Coello, J., Benavent-Corai, J., Roldán E., R.S. y Gomendio, M. (2009). Sperm competition promotes asymmetries in reproductive barriers between closely related species. *Evolution*, 63, 613-623.
- Martín-Coello, J., Dopazo, H., Arbiza, L., Ausió, J., Roldán E., R.S. y Gomendio, M. (2009). Sexual selection drives weak positive selection in protamine genes and high promoter divergence, enhancing sperm competitiveness. *Proc R Soc Lond.*, 276, 2427-2436.
- McDonough, C.E., Whittington, E., Pitnick, S. y Dorus, S. (2016). Proteomics of reproductive systems: Towards a molecular understanding of postmating, prezygotic reproductive barriers. *J. Proteomics*, 135, 26-37.
- Nynca, J., Arnold, G.J., Frohlich, T., Otte, K. y Ciereszko, A. (2014). Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins. *Proteomics*, 14, 1569-1573.
- Oliva, R., De Mateo, S. y Estanyol, J.M. (2009). Sperm cell proteomics. *Proteomics*, 9, 1004-1017.
- Palumbi, S.R. (2009). Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process. *Heredity*, 102, 66-76.
- Parker, G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biol Rev.*, 45, 525-567.
- Parsch, J. y Ellegren, H. (2013). The evolutionary causes and consequences of sex-biased gene expression. *Nat. Rev. Genet.*, 14, 83-87.
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Burgess, S.C. y Memili, E. (2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.*, 2. doi:10.1186/1752-0509-2-19
- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T.R. (2009). Sperm morphological diversity, en T.R. Birkhead, D.J. Hosken y S. Pitnick (eds.), *Sperm biology: an Evolutionary Perspective* (pp. 69-149). London: Academic press.
- Pitnick, S., Wolfner, M.F. y Suarez, S.S. (2009). Ejaculate-female and sperm-female interactions. En T.R. Birkhead, D.J. Hosken y S. Pitnick (eds.), *Sperm biology: an Evolutionary Perspective* (pp. 247-304). London: Academic press.
- Pizarri, T. y Parker, G.A. (2009). Sperm competition and sperm phenotype. En Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S, (eds.), *Sperm biology: an Evolutionary Perspective* (pp. 207-245). London: Academic press.
- Podlaha, O., Webb, D.M., Tucker, P.K. y Zhang, J. (2005). Positive selection for indel substitutions in the rodent sperm protein Catsper1. *Mol Biol Evol*, 22, 1845-1852.
- Ramm, S.A., McDonald, L., Hurst, J.L., Beynon, R.J. y Stockley, P. (2009). Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent seminal fluid and its functional significance in sperm competition. *Mol Biol Evol*, 26, 189-198.

- Ramm, S.A., Oliver, P.L., Ponting, C.P., Stockley, P. y Emes R.D. (2008). Sexual selection and the adaptive evolution of mammalian ejaculate proteins. *Mol Biol Evol*, 25, 207-219.
- Ramm, S.A., Schärer, L., Ehmcke, J. y Wistuba, J. (2014). Sperm competition and the evolution of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*, 20, 1169-1179.
- Rockman, M.V., Hahn, M.W., Soranzo, N., Zimprich, F., Goldstein, D.B. y Wray, G.A. (2005). Ancient and Recent Positive Selection Transformed Opioid cis-Regulation in Humans. *PLoS Biol*, 3:e387.
- Roldán E., R.S. y Gomendio, M. (2006). *Spermatology*. Nottingham: Nottingham Univeristy Press.
- Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jónsson, B., Schluter, D. y Kingsley, D.M. (2004). Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*, 428, 717-723.
- Skerget, S., Rosenow, M., Polpitiya, A. y Petritis, K. (2013). The Rhesus Macaque (Macaca mulatta) Sperm Proteome. *Mol Cell Proteomics*, 12, 3052-3067.
- Skerget, S., Rosenow, M.A., Petritis, K. y Karr, T.L. (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLoS One*, 10, e0140650.
- Soulsbury, C.D. (2010). Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *PLoS One*, 5, e9581.
- Soumillon, M., Necsulea, A., Weier, M., Brawand, D., Zhang, X., Gu, H., Barthès, P., Kokkinaki, M., Nef, S., Gnirke, A., *et al.* (2013). Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep*, 3, 2179-2190.
- Stein, K.K., Go, J.C., Lane, W.S., Primakoff, P. y Myles, D.G. (2006). Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*, 6, 3533-3543.
- Sucena, E. y Stern, D.L. (2000). Divergence of larval morphology between *Drosophila sechellia* and its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4530-4534.
- Swanson, W.J., Clark, A. G., Waldrip-Dail, H.M., Wolfner, M.F. y Aquadro, C.F. (2001). Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7375-7379.
- Swanson, W.J., Nielsen, R. y Yang, Q. (2003). Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 20, 18-20.
- Swanson, W.J. y Vacquier, V.D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genetics*, 3, 137-144.
- Torgerson, D.G., Kulathinal, R.J. y Singh, R.S. (2002). Mammalian sperm proteins are rapidly evolving: evidence of positive selection in functionally diverse genes. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1973-1980.
- Tourmente, M., Rowe, M., González-Barroso, M.M., Rial, E., Gomendio, M. y Roldán E., R.S. (2013). Postcopulatory Sexual Selection Increases ATP Content in Rodent Spermatozoa. *Evolution*, 67(6), 1836-1846, evo.12079.
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E. y Roldán E., R.S. (2015). Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation and relationships with sperm motility in mouse species. *J. Biol. Chem.*, 290, 20613-20626.
- Turner, L.M., Chuong, E.B. y Hoekstra, H.E. (2008). Comparative analysis of testis protein evolution in rodents. *Genetics*, 179, 2075-2089.

- Turner, L.M. y Hoekstra, H.E. (2008). Causes and consequences of the evolution of reproductive proteins. *Int J Dev Biol.*, 52, 769-780.
- Turner, L.M. y Hoekstra, H.E. (2008a). Reproductive protein evolution within and between species: maintenance of divergent ZP3 alleles in *Peromyscus*. *Mol. Ecol.*, Vol 17, pp. 2616–2628.
- Vacquier, V.D. y Swanson, W.J. (2011). Selection in the rapid evolution of gamete recognition proteins in marine invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3(11). 3:a002931.
- Vicens, A., Borziak, K., Karr, T.L., Roldán E., R.S. y Dorus, S. (2017). Comparative sperm proteomics in mouse species with divergent mating systems. *Mol. Biol. Evol.* msx084.
- Vicens, A., Lüke, L. y Roldán E., R.S. (2014). Proteins Involved in Motility and Sperm-Egg Interaction Evolve More Rapidly in Mouse Spermatozoa. *PLoS One*, 9, e91302.
- Vicens, A., Montoto, L.G., Couso-Ferrer, F., Keith, A. y Roldán E., R.S. (2015). Sexual selection and the adaptive evolution of PKDREJ protein in primates and rodents. *Mol Hum Reprod.*, 21, 146-56.
- Vicens, A. y Roldán E., R.S. (2014). Coevolution of Positively Selected *IZUMO1* and *CD9* in Rodents: Evidence of Interaction Between Gamete Fusion Proteins? *Biol. Reprod.*, 113(5), 1-9.
- Vicens, A., Tourmente, M. y Roldán E., R.S. (2014). Structural evolution of CatSper1 in rodents is influenced by sperm competition, with effects on sperm swimming velocity. *BMC Evol Biol.*, 14. doi: 10.1186/1471-2148-14-106.
- Wasbrough, E.R., Dorus, S., Hester, S., Howard-Murkin, J., Lilley, K., Wilkin, E., Polpitiya A., Petritis, K. y Karr, T.L. (2010). The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II). *J. Proteomics*. 73, 2171-2185.
- Whittington, E., Zhao, Q., Borziak, K., Walters, J.R. y Dorus, S. (2015). Characterisation of the *Manduca sexta* sperm proteome: Genetic novelty underlying sperm composition in Lepidoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 62, 183-193.
- Wilburn, D.B. y Swanson, W.J. (2015). From molecules to mating: Rapid evolution and biochemical studies of reproductive proteins. *J. Proteomics*, 135, 12-25.
- Wolfner, M.F. (2002). The gifts that keep on giving : physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, 88, 85-93.
- Wong, A. (2011). The Molecular Evolution of Animal Reproductive Tract Proteins : What Have We Learned from Mating-System Comparisons? *Int J Evol Biol*, 2011, 908735.
- Wyckoff, G.J., Wang, W. y Wu, C. (2000). Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man. *Nature*, 403, 304-309.
- Yang, Z. (2002). Inference of selection from multiple species alignments. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(6), 688-694.
- Zigo, M., Jonáková, V., Šulc, M. y Maňásková-Postlerová, P. (2013). Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *Int. J. Biol. Macromol.*, 61, 322-328.

EL PAPEL DE LOS EPIDIDIMOSOMAS EN LA TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS DURANTE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

Ahiezer Rodríguez Tobón,¹
Edith Arenas Ríos² y
Carmen Beltrán Núñez¹

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos.

^{*}Correo electrónico: ahiezerrod@yahoo.com.mx

²Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica del Espermatozoide, Ciudad de México.

1. Introducción

En vertebrados como los mamíferos, los espermatozoides que se producen en los túbulos seminíferos dentro de las gónadas masculinas no son capaces de fecundar al óvulo. Por lo anterior, deben sufrir una serie de cambios morfológicos y bioquímicos conforme recorren el tubo epididimario, que les permitan capacitarse para llevar a cabo la reacción acrosomal, el reconocimiento y la fecundación del gameto femenino dentro del tracto genital femenino (Cervantes *et al.*, 2008; Cooper, 2011; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015). La reacción acrosomal es un evento único de exocitosis del acrosoma, indispensable para que el espermatozoide fecunde al óvulo homólogo (Beltran *et al.*, 2016). Esta serie de cambios que le ocurren a los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo son conocidos como maduración espermática epididimaria y son ocasionados en conjunto por el tejido epitelial y el microambiente generado por las mismas células del tubo (Caballero *et al.*, 2010; Rodríguez-Tobón, 2011).

2. El tubo epididimario

El epidídimo es un único tubo contorneado que se encuentra adosado a la parte craneal del testículo y que puede medir de 3 a 80 m, dependiendo de la especie. Es responsable del transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides (Robaire *et al.*, 2006; Sullivan *et*

al., 2007). En mamíferos se han reconocido de manera general tres regiones anatómicas gruesas (cabeza, cuerpo y cola) (fig. 1), además del segmento inicial que se conecta con los túbulos eferentes (Arenas-Ríos *et al.*, 2005; Robaire *et al.*, 2006). En el conducto epididimario se han descrito diversos tipos celulares encargados de la síntesis, la secreción y la absorción de sustancias que entrarán en contacto directo con los espermatozoides (Serre y Robaire, 1998). Las células apicales se localizan en la parte inicial y en la zona intermedia del epidídimo de la rata adulta, y ocasionalmente en otros segmentos epididimarios en ratas de edad avanzada (Adamali y Hermo, 1996). Estas células se asemejan a las células principales, pero éstas presentan un núcleo característico esférico situado en la parte apical y no tienen contacto con la membrana basal (Adamali y Hermo, 1996; Robaire *et al.*, 2006). Debido a que las células apicales participan también en procesos de secreción y de endocitosis, se ha considerado que modifican el ambiente luminal del tubo epididimario, puesto que están involucradas en la degradación y eventual internalización de proteínas (Adamali y Hermo, 1996; Andonian y Hermo, 1999).

Las células estrechas, así como las apicales, sólo aparecen en el epitelio del segmento inicial y en la zona intermedia del epidídimo de rata y de ratón; se caracterizan por sus numerosas vesículas apicales localizadas en forma de copa que están involucradas en la endocitosis, además de secretar iones H^+ hacia la luz del tubo epididimario. Estas células se diferencian morfológicamente de las células principales y de las apicales por la expresión de diferentes proteínas, y porque pueden ser precursoras de las células claras (Serre y Robaire, 1998; Robaire *et al.*, 2006).

Las células claras no están en el segmento inicial del epidídimo de rata (Moore y Bedford, 1979), pero en muchas especies, incluyendo al humano, las podemos encontrar en las tres regiones del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006). Se distinguen por realizar una función endocítica mucho mayor que la efectuada por las células principales adyacentes, consideradas especializadas en la fagocitosis, sobre todo en la cola del

epidídimo; además, participan junto con las células estrechas en la acidificación del fluido luminal (Oko *et al.*, 1993; Andonian y Hermo, 1999; Robaire *et al.*, 2006).

Las células halo son pequeñas, con un estrecho borde citoplasmático y se localizan en todo el epidídimo. Éstas se encuentran normalmente en la base del epitelio y contienen un núcleo conformado por un número variable de gránulos densos, se han descrito como linfocitos o monocitos, sólo que no son linfocitos típicos migratorios. Entre las principales diferencias, están sus gránulos que contienen cuerpos multivesiculares y un gran retículo endoplásmico.

Anatómicamente cada región epididimaria se puede dividir, a su vez, en segmentos intrarregionales, formando lóbulos de túbulo epididimario enroscado, separados por septos de tejido conectivo (STC) que le brindan soporte y estabilidad al órgano en sí. Además de estas características, las células epiteliales de cada región del epidídimo expresan diferentes genes y sintetizan diversas proteínas que, junto con otras sustancias que se liberan al lumen, establecen el microambiente y cuando los espermatozoides recorren el conducto epididimario están en contacto directo con ese microambiente luminal específico (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2007). Este es el caso de la cabeza y el cuerpo, en donde se lleva a cabo la maduración de espermatozoides en la mayoría de especies de mamíferos. Sin embargo, en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* se ha reportado que es en la cola del epidídimo donde termina de madurar el espermatozoide (Cervantes *et al.*, 2008; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015a) y donde se almacena (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006).

3. Maduración espermática epididimaria

La microtopografía tan heterogénea que presenta la membrana del espermatozoide es en parte la clave del entendimiento de las complejas funciones del espermatozoide durante su existencia post-testicular (Eddy *et al.*, 1985; Schroter *et al.*, 1999; Eddy, 2006). Se ha observado que la

composición iónica, las moléculas orgánicas y las distintas proteínas que tienen contacto con los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo son lo que produce las continuas modificaciones, que permiten el aumento en la carga negativa de la membrana plasmática, la pérdida de la gota citoplasmática, el cambio en el coeficiente fosfolípidos/colesterol, la restructuración o remodelación de la forma del acrosoma, la disminución del diámetro de las mitocondrias, el incremento del movimiento progresivo y la adición, eliminación y modificación de proteínas (Lewis y Aitken, 2001; Ecroyd *et al.*, 2004; Naz y Rajesh, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2007; Fábrega *et al.*, 2011). En conjunto, a estos cambios que experimenta el espermatozoide se le conocen como maduración espermática epididimaria.

4. Secreciones apocrinas en el epidídimo

Las células epiteliales del epidídimo presentan diferencias región-específicas en su función y en los patrones de secreción de proteínas (Girouard *et al.*, 2009). Se ha descrito que una de las características que presentan las células principales y estrechas, de muchas especies de mamíferos, es la formación de vesículas en la parte apical. Dichas burbujas interactúan con los espermatozoides que recorren el túbulo epididimario y están involucradas en la transferencia de proteínas desde el tejido epitelial a la membrana de los espermatozoides (Saez *et al.*, 2003).

A las vesículas formadas en el tejido epitelial del ducto excurrente del macho y secretadas en el plasma seminal en varias especies de mamíferos, incluyendo conejos, primates, ovejas, perros, gatos, bovinos, caballos, ratas y humanos, se les conoce como prostasomas (Saez *et al.*, 2003; Rejraji *et al.*, 2006; Girouard *et al.*, 2009). Basados en el proceso clásico de secreción exocrina, diversos estudios han mencionado que las células epiteliales del túbulo epididimario participan en los procesos de secreción apocrina (apostasomas) (Aumuller *et al.*, 1999), solamente que al encontrarse dentro del túbulo epididimario han sido nombradas como “epididimosomas”. Estas

vesículas presentan una ultraestructura en apariencia electrodensa similar a los exosomas y tienen un tamaño variado que va de ~10 nm hasta 500 nm de diámetro (Griffiths *et al.*, 2008).

Yanagimachi *et al.* (1985) fueron los primeros en describir la interacción de unas vesículas de membrana encontradas en el lumen epididimario con los espermatozoides y consideraron que la membrana de los espermatozoides es susceptible de experimentar numerosos cambios durante su maduración. Lo anterior los llevó a asumir que las vesículas estarían involucradas en el transporte de diferentes moléculas –como el colesterol, enzimas y/o glicoproteínas– del tejido epididimario a la membrana de los espermatozoides, conforme éstos bajan de cabeza a cola del epidídimo.

Desde hace ya algunas décadas se sabe que el epitelio epididimario secreta las proteínas que interactuarán con el espermatozoide durante su paso por las diferentes regiones del epidídimo para generar un gameto completamente funcional (Robaire *et al.*, 2006). Ahora se acepta que los epididimosomas están implicados en la transferencia de proteínas relacionadas con la movilidad del espermatozoide, la interacción con la zona pelúcida y su capacidad de fecundación (Sullivan y Saez, 2013). Además, se han logrado reconocer proteínas como Rab (proteína G pequeña) y SNARE (receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida), que se encuentran relacionadas con el tráfico y fusión de vesículas (Sullivan y Saez, 2013). La composición de lípidos contenida en los epididimosomas varía a lo largo del túbulo epididimario. En el toro y en los múridos, el cociente fosfolípidos/colesterol incrementa 1.5 veces de la cabeza a la cola del epidídimo; en el caso particular del ratón, los epididimosomas son ricos en esfingomielina y ácidos grasos poliinsaturados (ácido araquidónico, principalmente) (Rejraji *et al.*, 2006).

Se ha planteado que al igual que en la membrana de los espermatozoides, los epididimosomas también poseen regiones abundantes en esfingolípidos y colesterol, conocidas como “balsas lipídicas” o regiones de membrana resistentes a detergentes (MRD) (Girouard *et al.*, 2009). Se ha descrito que la proteína

epididimal bovina (P25b) se asocia a MRD en epididimosomas de toro y que se transfiere a MRD del espermatozoide, por lo que pudiera utilizarse como blanco de proteínas secretadas por el epidídimo hacia una región específica de la membrana del espermatozoide (Sullivan y Saez, 2013). Sin embargo, existen otras proteínas, como el factor de migración de macrófagos (MIF) y la aldosa reductasa, que no se asocian a MRD (Sullivan y Saez, 2013).

5. Los epididimosomas y su participación en la maduración epididimaria

En mamíferos, el espermatozoide que ha alcanzado su madurez posee distintos dominios funcionales en la membrana plasmática que pueden estar regulando sus interacciones con los epididimosomas. En donde el dominio de la cabeza se encuentra relacionado con el reconocimiento de la zona pelúcida y con la penetración del óvulo, la pieza media proporciona la energía para el movimiento y la cola auxilia en la movilidad flagelar (Cooper, 2011). Por lo anterior, se espera que las proteínas adquiridas por el espermatozoide durante su maduración tengan una localización estratégica y funcional en las distintas estructuras del mismo.

Estos microdominios que se especializan en eventos de señalización celular y tráfico de vesículas son abundantes en glicosil fosfatidil inositol (GPI) y moléculas de señalización transmembranal como las proteínas tirosin-cinasas (PTK). Al transferirse proteínas de los epididimosomas al espermatozoide, algunas se pueden establecer como proteínas de membrana (Kirchhoff y Hale, 1996) o ser incorporadas en estructuras internas de la misma célula (Frenette *et al.*, 2005).

Muchos de los cambios moleculares que ocurren durante la maduración de los espermatozoides involucran proteínas estructurales, receptores en la superficie de la membrana, canales iónicos, hormonas, citocinas y agua, así como proteínas de la matriz extracelular. La actividad y disponibilidad de muchas de las proteínas se regulan por proteasas,

aunque se desconocen con exactitud las proteasas que participan en el proceso (Netzel-Arnett *et al.*, 2009).

Las proteínas secretadas en la región cefálica y corporal del epidídimo están involucradas en la adquisición de una marcada movilidad y la habilidad de unirse con la zona pelúcida, así como en la fusión con la membrana plasmática del ovocito (Turner *et al.*, 2003). Dichas proteínas también se relacionan con la protección contra el estrés oxidativo y la eliminación de espermatozoides defectuosos (Sullivan *et al.*, 2005; Rejraji *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2007). Las proteínas secretadas en la región caudal del epidídimo son necesarias para mantener la viabilidad y el potencial de fecundación de los espermatozoides almacenados (Saez *et al.*, 2003).

En especies como el toro, el cerdo, el carnero, los roedores y los caballos se ha demostrado que la incorporación de proteínas al espermatozoide desde el tejido epitelial epididimario sucede de forma regionalizada (Belleannee *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012), siendo algunas dirigidas a la parte de la membrana que cubre el acrosoma y otras a la pieza media del flagelo (Griffiths *et al.*, 2008; Martin-DeLeon, 2015).

Algunas moléculas que se encuentran en el acrosoma son modificadas durante la maduración espermática, entre las que destacan aquellas que contienen cadenas de carbohidratos, tales como D-galactosidasa y N-acetil-D-galactosamina, que durante la glicosilación y/o proteólisis disminuyen en tamaño molecular debido a la sustitución de varios de sus glicoconjugados (Toshimori, 1998). Esta reducción molecular se ha determinado en conejo (Mukerji y Meizel, 1979), humanos (Baba *et al.*, 1989), cuyo (Anakwe *et al.*, 1991), rata (Nagdas, 1992) y cerdo (Baba *et al.*, 1994). También se ha reportado en espermatozoides de cuyo y chimpancé que ciertos glicoconjugados que se adicionan durante la espermiogénesis a la membrana acrosomal y a toda la membrana plasmática se redistribuyen subsecuentemente a la región posterior de la cabeza, reduciendo su tamaño durante la maduración y migrando finalmente a la membrana interna del acrosoma durante la

reacción acrosomal (Myles *et al.*, 1984; Cowan *et al.*, 1986; Phelps *et al.*, 1990; Overstreet *et al.*, 1995).

Estudios recientes indican que la composición de los epididimosomas es muy variada en cuanto a proteínas, algunas de las cuales son más comunes y otras más particulares; lo anterior indica que su expresión está restringida de una población a otra de vesículas, dependiendo de la región del epidídimo donde se producen (Sullivan y Saez, 2013). En el epidídimo de distintas especies de mamíferos se han reportado diferentes poblaciones de epididimosomas, algunas diferenciadas de acuerdo con su ultraestructura y composición enzimática y otras por su densidad, así como por su composición de lípidos y de proteínas (Fornes *et al.*, 1995; Frenette *et al.*, 2010), por lo que se ha propuesto que cada población de epididimosomas es capaz de transferir un grupo particular de proteínas al espermatozoide durante su maduración e interactuar con él de manera diferente.

Del bagaje de proteínas secretadas por el tejido epididimario, algunas unidas a GPI son secretadas directamente al lumen epididimario y transferidas a los espermatozoides por medio de una apolipoproteína J o clusterina que, se sabe, acarrea lípidos en una gran variedad de biofluidos, como el que se encuentra en el túbulo epididimario. La clusterina se localiza abundantemente en el lumen del epidídimo y su participación se ha relacionado con facilitar al espermatozoide proteínas unidas a GPI, así como su remoción durante las modificaciones que sufre la membrana (Martin-DeLeon, 2015). Entre las proteínas transportadas por esta vía están: la molécula de adhesión al espermatozoide de múridos (SPAM1), la proteína relacionada a patogénesis (GLIPR1L1), la cual está involucrada en la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito, así como con algunos miembros de las familias de hialuronidasas (HYAL3, HYAL5 y HYAL2), las serina proteasas unidas a membrana (PRSS21), P34H (humano), P26H (hámster) y P25B (toro) (Legare *et al.*, 1999; Frenette y Sullivan, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Martin-DeLeon, 2015).

Los epididimosomas, al igual que la clusterina, transportan proteínas unidas a GPI, por lo que se considera que la entrega de proteínas –ya sea de manera vesicular o no– está mediada por interacciones hidrofóbicas (Sullivan y Saez, 2013). Las proteínas asociadas a los epididimosomas identificadas hasta el momento son CD52 (antes HE5), que forma parte de la superficie de los linfocitos que se encuentra en el humano, primates y rata; la molécula de adhesión al espermatozoide de múridos (SPAM1)/PH-20, cuyo homólogo se ha reportado en humanos, primates, bovinos y ratas; la proteína P26h, secretada en el epidídimo y localizada en espermatozoides de hámster (relacionada con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida) y sus ortólogos P34H (humano), P25m (ratón), P25b (toro) y P31m (primate); además de la glutatión peroxidasa tipo 5 (GPX5), vinculada con la protección ante el estrés oxidativo y la integridad del ADN; la metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (MMSDH); el factor de migración de macrófagos (MIF), que se asocia a las fibras densas del espermatozoide, pudiendo estar relacionado con la eliminación del Zn^{2+} que afecta a los grupos sulfhídrido libres en el flagelo del espermatozoide (Sullivan *et al.*, 2005; Caballero *et al.*, 2010; Sullivan y Saez, 2013; Martin-DeLeon, 2015); las proteínas aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa, que pueden modular la movilidad durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo; la liprina $\alpha 3$, relacionada con la reacción acrosomal; la proteína cinasa cSrc, involucrada en la movilidad de los espermatozoides (Krapf *et al.*, 2012; Sullivan y Saez, 2013), y finalmente la ubiquitina y la proteína 1 asociada al espermatozoide (ELSPBP1), ambas vinculadas con la eliminación de espermatozoides defectuosos, donde la ubiquitina lleva a cabo la degradación enzimática de proteínas mediada por proteozomas.

Para concluir, la familia de proteínas que contienen un dominio de unión a desintegrina y metaloproteasas (ADAMs) están ancladas a la membrana. Además, se sabe que los miembros de dichas familias están ampliamente distribuidos en diferentes especies y presentes en una gran variedad de tejidos (Cho, 2012). ADAM7 es una de las proteínas transportadas de los

epididimosomas a la membrana plasmática de los espermatozoides (Oh *et al.*, 2009). Debido a sus características como proteína de membrana, ha generado la idea de que existe fusión entre el espermatozoide y los epididimosomas; sin embargo, dentro de la literatura reportada existe controversia respecto a si estas vesículas se fusionan o no a la membrana de los espermatozoides (Martin-DeLeon, 2015).

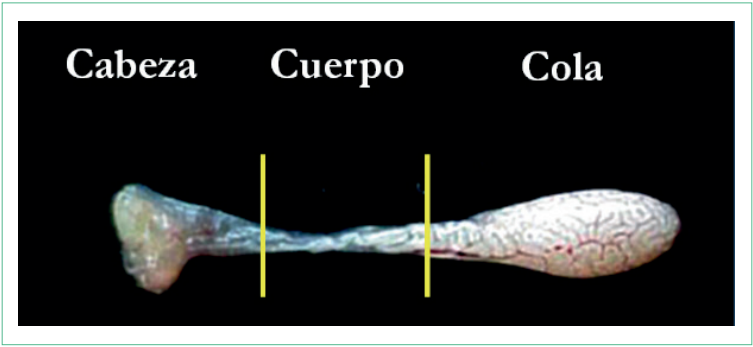
Schwarz *et al.* (2013) demostraron que los epididimosomas tomados de la región cefálica del epidídimo de toro presentan una mayor capacidad fusogénica con la membrana de los espermatozoides obtenidos de esta región, en comparación con las vesículas de la región caudal. La fusión del espermatozoide con los epididimosomas fue analizada evaluando la compensación del autoapagado de la fluorescencia del R18 (Octadecyl rhodamine-B, colorante que se integra con la parte lipídica de la membrana plasmática). Los investigadores determinaron que la tasa de fusión *in vitro* entre los epididimosomas y los espermatozoides depende tanto de la concentración de protones como del tiempo, ya que la disminución del pH favorece la fusión de membranas en 180 segundos. La velocidad de fusión se redujo gradualmente durante un periodo de 10 min (Schwarz *et al.*, 2013). Adicionalmente, los resultados fueron corroborados con análisis de microscopía de fluorescencia a pH 5 y 6.5. Después de la fusión *in vitro*, se incrementó la señal de fluorescencia, siendo predominantemente visible en la cabeza, cuello y pieza media del espermatozoide.

6. Perspectivas

Faltan muchos estudios por hacer para determinar la composición proteica de las vesículas secretadas por el tejido epitelial epididimario (epidimosomas), e identificar el vasto número de proteínas que se transportan por estas vesículas. Investigaciones recientes buscan determinar cuáles proteínas forman parte de las vesículas secretadas por parte del tejido epitelial epididimario, que posteriormente se unirán a los espermatozoides que recorren el epidídimo de cabeza a cola, con el propósito de cotejar qué proteínas se encuentran

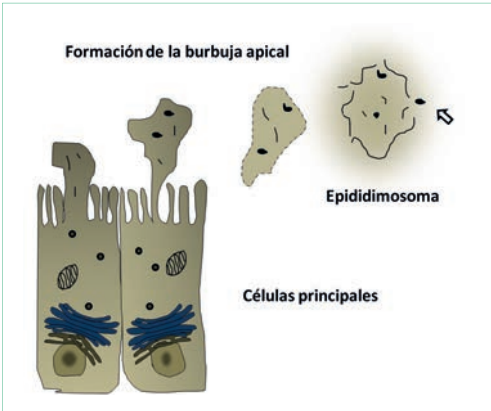
presentes que no se localizaban en las células recién formadas en los testículos. Lo anterior ha permitido que muchas de estas proteínas sean consideradas potenciales blancos para impedir la capacidad fértil de los espermatozoides. Sin embargo, se debe continuar con las investigaciones en la búsqueda de moléculas exclusivas de los espermatozoides, para no afectar la funcionalidad de ningún otro tipo celular.

Figura 1. Principales regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola.



Modificada de Cervantes *et al.*, 2008.

Figura 2. Esquema de la secreción apocrina en las células principales del túbulo epididimario.



Referencias

- Adamali, H. I., y Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology*, 17, 208-222.
- Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H. y Baker, M. A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology*, 9, 554-564.
- Anakwe, O. O., Sharma, S., Hoff, H. B., Hardy, D. M. y Gerton, G. L. (1991). Maturation of guinea pig sperm in the epididymis involves the modification of proacrosin oligosaccharide side chains. *Molecular Reproduction and Development*, 29, 294-301.
- Andonian, S., y Hermo, L. (1999). Cell- and region-specific localization of lysosomal and secretory proteins and endocytic receptors in epithelial cells of the cauda epididymidis and vas deferens of the adult rat. *Journal of Andrology*, 20, 415-429.
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M. A., Mercado, P. E. y Rosado, A. (2005). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 83, 1556-1565.
- Aumuller, G., Wilhelm, B. y Seitz, J. (1999). Apocrine secretion--fact or artifact? *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 181, 437-446.
- Baba, T., Kashiwabara, S., Watanabe, K., Itoh, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada, M., Fukamizu, A. y Arai, Y. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 11920-11927.
- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S. y Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 31845-31849.
- Baker, M. A., Nixon, B., Naumovski, N. y Aitken, R. J. (2012). Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 211-217.
- Beltrán, C., Trevino, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M. y Darszon, A. (2016). Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. En Mario G. Buffone, (coord.-ed.), *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* (pp. 35-69). Suiza: Springer International Publishing Switzerland.
- Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L., Dacheux, J. L. y Dacheux, F. (2011). Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, 11, 1952-1964.
- Caballero, J., Frenette, G. y Sullivan, R. (2010). Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International*, 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/757194>

- Cervantes, M.I., Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A., López-Wilchis, R., Ambriz, D. y Rosado, A. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54, 196-204.
- Cho, C. (2012). Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. *Nature Reviews Urology*, 9(10), 550-560.
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13, 130-138.
- Cowan, A. E., Primakoff, P. y Myles, D. G. (1986). Sperm exocytosis increases the amount of PH-20 antigen on the surface of guinea pig sperm. *The Journal of Cell Biology*, 103, 1289-1297.
- Ecroyd, H., Asquith, K. L., Jones, R. C. y Aitken, R. J. (2004). The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Developmental Biology*, 268, 53-63.
- Eddy, E., Vernon, R., Muller, C., Hahnel, A. y Fenderson, B. (1985). Immunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation. *American Journal of Anatomy*, 174, 225-237.
- Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. En J. D. Neill y P. Wassarman (eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 3-54). USA: Academic Press.
- Fábrega, A., Puigmule, M., Yeste, M., Casas, I., Bonet, S. y Pinart, E. (2011). Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 76, 1356-1366.
- Fornes, W. M., Sosa, M. A., Bertini, F. y Burgos, M. H. (1995). Vesicles in rat epididymal fluid. Existence of two populations differing in ultrastructure and enzymatic composition. *Andrologia*, 27, 233-237.
- Frenette, G., y Sullivan, R. (2001). Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development*, 59, 115-121.
- Frenette, G., Legare, C., Saez, F. y Sullivan, R. (2005). Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Molecular Human Reproduction*, 11, 575-582.
- Frenette, G., Girouard, J., D'Amours, O., Allard, N., Tessier, L. y Sullivan, R. (2010). Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biology of Reproduction*, 83, 473-480.
- Girouard, J., Frenette, G. y Sullivan, R. (2009). Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 80, 965-972.
- Griffiths, G. S., Galileo, D. S., Reese, K. y Martin-Deleon, P. A. (2008). Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Molecular Reproduction and Development*, 75, 1627-1636.
- Kirchhoff, C., y Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Molecular Human Reproduction*, 2, 177-184.

- Krapf, D., Ruan, Y. C., Wertheimer, E. V., Battistone, M. A., Pawlak, J. B., Sanjay, A., Pilder, S. H., Cuasnicu, P., Breton, S. y Visconti, P. E. (2012). cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Developmental Biology*, 369, 43-53.
- Legare, C., Berube, B., Boue, F., Lefievre, L., Morales, C. R., El-Alfy, M. y Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Molecular Reproduction and Development*, 52, 225-233.
- Lewis, B. y R. J. Aitken. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64, 1545-1556.
- Martín-DeLeón, P. A. (2015). Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian Journal of Andrology*, 17, 720-725.
- Moore, H. D., y Bedford, J. M. (1979). Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *The Anatomical Record*, 193, 293-311.
- Mukerji, S. K. y Meizel, S. (1979). Rabbit testis proacrosin. Purification, molecular weight estimation, and amino acid and carbohydrate composition of the molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 11721-11728.
- Myles, D. G., Primakoff, P. y Koppel, D. E. (1984). A localized surface protein of guinea pig sperm exhibits free diffusion in its domain. *The Journal of Cell Biology*, 9, 1905-1909.
- Nagdas, S. K., Skudlarek, M. D., Orgebin-Crist, M. C. y Tulsiani, D. R. (1992). Biochemical alterations in the proacrosin-acrosin system during epididymal maturation of the rat spermatozoa. *Journal of Andrology*, 13, 36-43.
- Naz, R. K. y Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2. doi.org/10.1186/1477-7827-2-75
- Netzel-Arnett, S., Bugge, T. H., Hess, R. A., Carnes, K., Stringer, B. W., Scarman, A. L., Hooper, J. D., Tonks, I. D., Kay, G. F. y Antalis, T. M. (2009). The glycosylphosphatidylinositol-anchored serine protease PRSS21 (testisin) imparts murine epididymal sperm cell maturation and fertilizing ability. *Biology of Reproduction*, 81, 921-932.
- Oh, J. S., Han, C. y Cho, C. (2009). ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Molecules and Cells*, 28(5), 441-446.
- Oko, R., Hermo, L., Chan, P. T., Fazel, A. y Bergeron, J. J. (1993). The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *The Journal of Cell Biology*, 123, 809-821.
- Overstreet, J. W., Lin, Y., Yudin, A. I., Meyers, S. A., Primakoff, P., Myles, D. G., Katz, D. F. y Vandevort, C. A. (1995). Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biology of Reproduction*, 52, 105-114.
- Phelps, B. M., Koppel, D. E., Primakoff, P. y Myles, D. G. (1990). Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *The Journal of Cell Biology*, 111, 1839-1847.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P. y Dreves, J. R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, 74, 1104-1113.

- Robaire, B., Hinton, B. T. y Orgebin-Crist, M. C. (2006). The Epididymis. En J. D. Neill y P. Wassarman (eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp.1071-1148). USA: Academic Press.
- Rodríguez-Tobón, A. (2011). Análisis macro y micro estructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Rodríguez-Tobón, A., Fierro, R., León-Galván, M. A., Rosado, A., Cortés-Barberena, E. y Arenas-Ríos, E. (2015). Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica (stockholm)*, 97(3), 310-318.
- Rodríguez-Tobón, A., León-Galván, M. A. y Arenas-Ríos, E. (2015a). Epididymal sperm maturation in bats with prolonged sperm storage. *Animal and Veterinary Sciences Special Issue: Advances in Bat's Reproduction*, 3, 1-7.
- Saez, F., Frenette, G. y Sullivan, R. (2003). Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *Journal of Andrology*, 24, 149-154.
- Schroter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. e Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update*, 5, 302-313.
- Schwarz, A., Wennemuth, G., Post, H., Brandenburger, T., Aumuller, G. y Wilhelm, B. (2013). Vesicular transfer of membrane components to bovine epididymal spermatozoa. *Cell and Tissue Research*, 353, 549-561.
- Serre, V. y Robaire, B. (1998). Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 58, 497-513.
- Sidhu, K. S., Mate, K. E., Gunasekera, T., Veal, D., Hetherington, L., Baker, M. A., Aitken, R. J. y Rodger, J. C. (2004). A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction*, 127, 95-103.
- Sullivan, R., Frenette, G. y Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology*, 9, 483-491.
- Sullivan, R., y Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 146, R21-35.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. y Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood cells, Molecules and Diseases*, 35, 1-10.
- Toshimori, K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research*, 293(2), 177-187.
- Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P. y Nguyen, Q. A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, 125, 871-878.
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F. y Yanagimachi, H. (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the chinese hamster. *The American Journal of Anatomy*, 172, 317-330.
- Zhang, H., Jones, R. y Martin-DeLeon, P. A. (2004). Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 22, 653-661.

ADENOSINA 3',5'-MONOFOSFATO CÍCLICO EN LA FISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE DEL ERIZO DE MAR

Carmen Beltrán Núñez¹

¹ Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Correspondencia: Av. Universidad 2001, colonia Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México.
Correo electrónico: beltran@ibt.unam.mx

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT-UNAM (IN206016) y Conacyt Fronteras de la ciencia 71 (2016-2018). Se agradece al Dr. Alberto Darszon la lectura crítica y el apoyo técnico del Biol. José Luis de la Vega Beltrán, M. en MM. Francisco Fabio Herrera Rodríguez, M. en C. Paulina Torres Rodríguez, Laboratorista J. Antonio Blancas Naranjo, Srío. Leonel Linares Labastida, y en Microscopía Confocal: Q.F.B. Xóchitl Alvarado Affantranger y M. en C. Andrés Saralegui Amaro.

1. Introducción

La concentración de AMPc en las células depende de la actividad de las adenilil ciclasas (ACs) (Cooper, 2003; Cooper y Crossthwaite, 2006; Hanoune y Defer, 2001), que lo sintetizan, y de las fosfodiesterasas (FDE) (revisado en Ahmad *et al.*, 2015; Francis *et al.*, 2011; Maurice *et al.*, 2014), que lo hidrolizan. Este segundo mensajero puede actuar de manera directa uniéndose a canales iónicos (Kaupp y Seifert, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 1998; Zufall *et al.*, 1997), activando a la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (Epac) (De Rooij *et al.*, 1998), o de manera indirecta, mediante la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Beavo y Brunton, 2002) que fosforila proteínas, regulando su actividad.

2. Las adenilil ciclasas (ACs)

Las ACs son enzimas con una distribución ubicua. En células somáticas de mamífero existen dos tipos de ACs: las de membrana (ACm) y la soluble (sAC). Hay nueve genes distintos que codifican para las ACm (ACm1-9), cuyo patrón de expresión y regulación es diferente en dichas células somáticas (Taussig y Gilman, 1995). Las ACm tienen como sustrato al MgATP y se regulan de manera diferencial por proteínas G, por forskolina –compuesto no fisiológico extraído de la planta *Coleus forskohlii*– (Hanoune y Defer, 2001), por cinasas (PKA y/o proteína cinasa estimulada por diacilglicerol

(PKC) o por otras moléculas de señalización como el Ca^{2+} y la calmodulina (CaM). La sAC (Buck *et al.*, 1999), descrita originalmente en extractos de testículo de rata (Braun y Dods, 1975), se estimula por bicarbonato y por Ca^{2+} , pero a diferencia de las ACm, su sustrato es el MnATP (Chen, 2000; Jaiswal y Conti, 2003; Litvin *et al.*, 2003; Zippin *et al.*, 2003).

3. La actividad de AC en los espermatozoides de erizo de mar

La actividad de AC se estudió inicialmente en los espermatozoides de erizo de mar (eem) (Garbers y Kopf, 1980; Garbers, 1989; Kopf y Garbers, 1980), cuando se pensaba que sólo existían las ACm (Cooper, 2003; Cooper y Crosssthaite, 2006; Hanoune y Defer, 2001). En esa época se observó que los eem tenían una actividad de AC inusualmente alta, comparada con la de células somáticas (en Mourelle *et al.*, 1984). Además, se encontró que tanto en este sistema (Garbers, 1981) como en espermatozoides de otras especies, la actividad dependiente de MnATP era mucho mayor que la dependiente de MgATP. Se sabe que en eem la actividad de AC se regula por proteínas G (Capasso *et al.*, 1990), por pH y por Ca^{2+} (Bookbinder *et al.*, 1990; Cook y Babcock, 1993; Kopf y Garbers, 1980; Mourelle *et al.*, 1984; Watkins *et al.*, 1978), así como por hiperpolarización de la membrana plasmática (Beltrán *et al.*, 1996). Aunque la elevación en los niveles de AMPc inducida por hiperpolarización de los espermatozoides es independiente de Ca^{2+} , es claro que dichos niveles aumentan en presencia de Ca^{2+} y que preceden a la RA (Beltrán *et al.*, 1996), como se observó en cabezas aisladas de los espermatozoides (Garbers, 1981). Dado que dos componentes de la envoltura del óvulo hiperpolarizan a los espermatozoides, un polímero de fucosa sulfatada (FSP) y el decapeptido speract (GFDLNGGGVG, regulador de la movilidad del espermatozoide), se pensó que era posible que la activación de la AC participara en la regulación de la RA, la movilidad y la quimiotaxis del eem, como en mamíferos (Esposito *et al.*, 2004; Spehr *et al.*, 2003; Visconti *et al.*, 1995).

4. La adenilil ciclasa soluble en los eem

La fuente más importante de AMPc (~94%) en el eem es la AC soluble (SUsAC, en Vacquier *et al.*, 2014). Esta enzima purificada parcialmente (PM ~190 kDa) de eem *Strongylocentrotus purpuratus* (Bookbinder *et al.*, 1990) se clonó y secuenció de una biblioteca de testículos de la misma especie (SUsAC; Nomura *et al.*, 2005). En espermatozoides de *S. purpuratus*, la enzima se distribuye a lo largo del mismo e incluye las áreas del acrosoma y de la mitocondria (Beltrán *et al.*, 2007a; Bookbinder *et al.*, 1990). La SUsAC, como la de mamífero (Chen, 2000; Jaiswal y Conti, 2003; Litvin *et al.*, 2003), se estimula por bicarbonato, pero a diferencia de ésta, la de erizo de mar lo hace también por pH alcalino y no por Ca^{2+} (Nomura *et al.*, 2005). A pesar de que la SUsAC tiene cinco sitios posibles de fosforilación por PKA y de que en condiciones *in vitro* se fosforila por PKA y se une a CaM-Agarosa (Bookbinder *et al.*, 1990; Bookbinder *et al.*, 1991), su actividad no se estimula por PKA ni por CaM (Nomura *et al.*, 2005).

5. Las ACs de membrana (ACm) en el eem

El genoma del erizo *S. purpuratus*² contiene cinco isoformas predichas de las ACm (ACm1, XP_787811; ACm2, XP_780688; ACm3, XP_011667569.1; ACm5, XP_787809 y ACm9, XP_798394), de las cuales cuatro (ACm1 [fig. 1], ACm2, ACm5 y ACm9) se localizaron mediante experimentos de inmunofluorescencia (IF) distribuidas de manera diferencial en eem (Vacquier *et al.*, 2014) y de “Western Blot” (WB) en membranas de cabeza o de flagelos aislados de los espermatozoides de la misma especie (Beltrán *et al.*, 2007a). En el mismo trabajo demostramos de manera funcional que la actividad de AC de la fracción particulada (precipitado de 200,000

² http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=7668&build

xg) de espermatozoides completos de *S. purpuratus* se estimula con NaF (que estimula proteínas G, las cuales modulan ACm) y por forskolina, que activa las isoformas de ACm1-8. También observamos que la estimulación con forskolina se previene por 2',5'-dideoxiadenosina (DDA, inhibidor permeable de ACm). La estimulación de la actividad de AC por forskolina la encontramos en las membranas purificadas de flagelos de los espermatozoides, corroborando la presencia de ACm en los mismos (Beltrán *et al.*, 2007a). Existen evidencias de la presencia de ACm tanto en eem *Paracentrotus lividus* (Capasso *et al.*, 1990) como en mamíferos (Baxendale y Fraser, 2003; Leclerc *et al.*, 1996; Liguori *et al.*, 2004). Dado que la SUsAC del eem no se estimula por Ca^{2+} y que la única isoforma de las ACm que se encuentra específicamente en el área del acrosoma del eem es la ACm1 (fig. 1), cuyo ortólogo en mamífero pertenece al grupo I (ACm1, ACm3 and ACm8) de las estimulables por Ca^{2+} y CaM (revisado en Vacquier *et al.*, 2014), es posible que la ACm1 sea la enzima responsable –al menos en parte– del aumento en los niveles de AMPc cuando los eem se hiperpolarizan en presencia de Ca^{2+} (Beltrán *et al.*, 1996). Lo anterior respalda la participación de las ACm en la RA del eem.

6. El AMPc y la reacción acrosomal (RA)

El objetivo del espermatozoide es fecundar al óvulo y para lograrlo, la célula deben experimentar la reacción acrosomal (RA). Ésta es un proceso complejo que deben experimentar a los espermatozoides de las especies con acrosoma (vesícula con pH ácido) para poder fecundar al óvulo homólogo, el cual se ha conservado desde los invertebrados marinos hasta los mamíferos y se compone de una serie de cambios morfológicos y fisiológicos. Los primeros consisten en la exocitosis de la vesícula acrosomal y de una polimerización de actina dependiente de pH intracelular (pH_i) (Tilney *et al.*, 1978), que conduce a la formación del túbulo acrosomal, exponiendo una nueva membrana cubierta por la proteína bindina que interactuará con el óvulo

(Zigler *et al.*, 2005). Fisiológicamente, la RA se induce de manera especie-específica por polímeros de fucosa sulfatados (PFS) de la cubierta de gelatina del óvulo (EJ) (Alves *et al.*, 1997). En erizo de mar el PFS es el inductor natural de la RA, que al interactuar con el receptor de la gelatina (suREJ1) en la membrana plasmática del espermatozoide (Moy *et al.*, 1996; SeGall y Lennarz, 1979; Vacquier y Moy, 1997), dispara cambios en el potencial de membrana (E_m) dependientes de K^+ y aumentos en el pH_i y en la $[Ca^{2+}]_i$ y de sodio ($[Na^+]_i$), así como en los niveles de AMPc, inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y de ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) (revisado en Darszon *et al.*, 2011). La unión del PFS a su receptor también estimula las actividades de la óxido nítrico sintasa (NOS), la fosfolipasa D, la AC y la PKA, que a su vez fosforila proteínas (revisado en Neill y Vacquier, 2004).

En el laboratorio, la RA puede inducirse en los eem de manera natural con la envoltura (gelatina o “EJ”) del óvulo homólogo, o con el PFS (Hirohashi *et al.*, 2008) contenido en ella. En este modelo (eem) la RA también se puede inducir artificialmente, ya sea aumentando el pH extracelular a 9.0, o mediante el ionóforos de Ca^{2+} , A23187 o el antiportador K^+/H^+ , nigericina (Hinkley *et al.*, 1986; Kopf y Garbers, 1980), y todos elevan los niveles de AMPc dependiendo de Ca^{2+} externo (Garbers, 1989, revisado en Beltrán *et al.*, 2007a; Neill *et al.*, 2004). Las cabezas aisladas de eem contienen AC, PDE de AMPc, PKA, y CaM. Tanto en éstas (Garbers, 1981), como en las células intactas (Beltrán *et al.*, 1996), los aumentos en AMPc preceden a los cambios morfológicos asociados a la RA, lo cual indica la participación del AMPc en aquella. Sin embargo, esta conclusión se tendrá que sustentar con experimentos de mejor resolución temporal.

Utilizando espermatozoides de *S. purpuratus* (Beltrán *et al.*, 2007a) mostramos que su exposición a DDA inhibe en parte los aumentos de los niveles de AMPc (37%) y de RA (49%) inducidos con “EJ”, lo cual sugiere la participación de ACm en la RA (Beltrán *et al.*, 2007a), como ocurre en espermatozoides de mamífero (Leclerc *et al.*, 1996; Liguori *et al.*, 2004; Livera *et al.*, 2005; Wertheimer *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que los espermatozoides de ratón tienen actividad de AC que se estimula por forskolina de manera significativa, en comparación con la de ratones nulos en la ACm3, y que los resultados de experimentos de inmunofluorescencia muestran que dicha enzima se localiza en el área del acrosoma del espermatozoide (Livera *et al.*, 2005) de manera similar a la ACm1 (fig. 1) en los eem (Beltrán *et al.*, 2007a). Lo anterior, junto con el hecho de que ratones carentes del gen que codifica para la ACm3 son infértiles debido a que tienen disminuida la movilidad y la RA espontánea aumentada (Livera *et al.*, 2005), insinúa que esta enzima participa en ambas funciones. De manera interesante, cuando los eem *Lytechinus pictus* se hiperpolarizan con gelatina (EJ; de -43.6 ± 1.7 a -52.0 ± 0.0 mV) o artificialmente diluyéndolos en agua de mar carente de K^+ , pero conteniendo valinomicina (ionóforo de K^+ ; -43.6 ± 1.7 a -130.4 ± 6.7 mV), los niveles de AMPc se estimulan 2.9 y 2.2 veces, respectivamente. No obstante, el aumento en los niveles de AMPc disminuye de 2.2 a sólo 1.9 cuando se elimina el Ca^{2+} del agua de mar carente de K^+ (Beltrán *et al.*, 1996). Además, los resultados de experimentos de doble tinción por inmunofluorescencia (fig. 1), con anti-ACm1 y anti-faloidina acoplada a Alexa 495 que marca actina (indicador de RA en eem; Su *et al.*, 2005), muestran que cuando se induce la RA, la señal de fluorescencia correspondiente a la ACm1 mengua, corroborando la presencia de ACm1 en el área del acrosoma del eem (Romero, 2013). Lo anterior, aunado al hecho de que la ACm1 pertenece –como ya mencionamos– al grupo de las ACm estimulables por Ca^{2+} y CaM (revisado en Vacquier *et al.*, 2014), indica fuertemente que la ACm1 podría participar en la RA del eem, como se sugirió en espermatozoides de ratón. Está reportado que la reactividad de Gs se pierde en los espermatozoides reaccionados de ratón (Wertheimer *et al.*, 2013), lo cual es consistente con la localización en el área del acrosoma de ambas proteínas, ACm1 y Gs.

7. El AMPc y la movilidad de los espermatozoides

Desde la década de los 80 se consideró que el AMPc regulaba la movilidad en un modelo de eem permeabilizados con el detergente Tritón X-100 (Murofushi *et al.*, 1986; Tash, 1989; Tash *et al.*, 1986; Tash y Means, 1983). Los eem están inmóviles en las gónadas debido a un bajo pH_i por la alta concentración de CO_2 . Cuando los espermatozoides se liberan al agua de mar, cuyo pH es de 8.0, hay un flujo de H^+ aumentando el pH_i de 7.2 a 7.6 (Lee *et al.*, 1983). Este incremento activa tanto a la SUsAC (Nomura *et al.*, 2005), como a las dineinas, ATPasas que se accionan con pH alcalino (7.5-8.0) (Christen *et al.*, 1983) y principales consumidoras de ATP que se sintetiza en la única mitocondria del espermatozoide (fig. 2). De lo anterior se concluye que la movilidad y la respiración están vinculadas por la regulación del pH_i (Christen *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1985). Como el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) se puede activar por la hiperpolarización del espermatozoide (Lee, 1984 y 1985), es posible que la estimulación de la actividad de AC por hiperpolarización (Beltrán *et al.*, 1996) esté mediada por el aumento de pH_i ocasionado al activarse el sNHE, que tiene un dominio sensor de voltaje (Wang *et al.*, 2003).

El speract es el primer péptido activador de los espermatozoides (SAP, revisado en Beltrán *et al.*, 2007; Darszon *et al.*, 2008; Darszon *et al.*, 2011; Nishigaki *et al.*, 2014; Suzuki, 1995), que se purificó y caracterizó de la cubierta de óvulos de *S. purpuratus*, *L. pictus* y *Hemicentrotus pulcherrimus* (Hansbrough y Garbers, 1981; Suzuki *et al.*, 1981). Concentraciones picomolares de este SAP incentivan la movilidad, la respiración y el metabolismo de fosfolípidos de los espermatozoides (Hansbrough *et al.*, 1980; Harumi *et al.*, 1992), además de inducir aumentos en los niveles de GMPc y AMPc (Kopf *et al.*, 1979). Los niveles de ambos nucleótidos los determinan las actividades de guanilil ciclase (GC) y adenilil ciclase (AC) que los sintetizan, respectivamente, y las fosfodiesterasas (FDE), que los hidrolizan. Aunque inicialmente se reportó que la actividad de FDE se restringe a los

flagelos (Sano, 1976; Toowicharanont y Shapiro, 1988), es poco probable que eso sea así, ya que también la cabeza tiene actividad de AC (Garbers, 1981). Es posible que la actividad a la que se refieren los trabajos anteriores corresponda a la FDE5, la cual es específica para GMPc (producido por la GC), que sí se localiza sólo en el flagelo del espermatozoide. Sabemos que el flagelo de espermatozoides de *S. purpuratus* contiene tanto la SUsAC como al menos 2 ACm: la ACm2 y la ACm9 (Beltrán *et al.*, 2007a; Vacquier *et al.*, 2014), y que en la movilidad de los espermatozoides de esta especie participa principalmente la actividad de sAC (Vacquier *et al.*, 2014). Como ya mencionamos, de las nueve isoformas de las ACm descritas en células somáticas (Hanoune y Defer, 2001), al menos cuatro están en el eem de *S. purpuratus*, de las cuales la ACm2 y la ACm9 tienen una distribución parecida a la SUsAC que incluye al flagelo (Beltrán *et al.*, 2007a; Vacquier *et al.*, 2014). Además, la DDA (inhibidor permeable con IC₅₀ de 45 μ M que se une de manera no competitiva al sitio P de las ACm; Schuh *et al.*, 2006) modifica el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus* (Loza-Huerta, 2007). Los resultados de experimentos en que los eem de *S. purpuratus* se preincubaron durante 30 minutos con concentraciones de 75-300 μ M de DDA, mostraron que dicho inhibidor no afecta la velocidad de nado circular de los espermatozoides (Loza-Huerta, 2013). Por el contrario, la incubación de los espermatozoides de la misma especie durante 10 minutos con SQ22536 (otro inhibidor de las ACm con IC₅₀ de 200 μ M e igual mecanismo de acción que la DDA; Schuh *et al.*, 2006) inhibe poco, pero significativamente (1 mM ~25% y 2 mM ~30%), la velocidad de nado circular de las células. Lo anterior junto con el hecho de que la ACm2 se regula por PKC (Cooper, 2003; Cooper y Crosssthaite, 2006; Hanoune y Defer, 2001, revisado en Vacquier *et al.*, 2014), que la movilidad del espermatozoide es sensible también a inhibidores de PKC (White *et al.*, 2007) y que el flagelo del eem contiene sustratos fosforilados por PKC (Loza-Huerta *et al.*, 2013), sugiere la participación de la actividad de ACm en la movilidad. Es importante considerar que el efecto de inhibidores de

ACm y de PKC sólo se evaluó en la velocidad de nado circular (Loza-Huerta, 2013) y que el espermatozoide tiene al menos tres tipos de movilidad (circular, vibratorio y rectilíneo; Loza-Huerta, 2007). Como mencionamos en la sección anterior, los ratones nulos en ACm3 son subfértiles y sus espermatozoides tienen disminuida la movilidad (Livera *et al.*, 2005), lo cual apoya la participación de ACm en la movilidad de los eem.

7.1 *El AMPc y la quimiotaxis de los espermatozoides*

El erizo de mar es el primer modelo animal en el cual se documentó el fenómeno de la quimiotaxis (Lillie, 1912), la capacidad de los espermatozoides para nadar hacia los óvulos en respuesta a señales químicas (Darszon *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2016; Kaupp y Álvarez, 2016; Miller, 1985; Yoshida y Yoshida, 2011). En este modelo, los espermatozoides son atraídos al óvulo por péptidos activadores (SAPs), los cuales difunden de la envoltura de gelatina del óvulo (revisado en Darszon *et al.*, 2008; Nishigaki *et al.*, 2014; Suzuki, 1995). En *Arbacia punctulata* (Kopf *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 1984; Ward *et al.*, 1985) y *L. pictus* (Guerrero *et al.*, 2010; Hansbrough y Garbers, 1981; Kopf *et al.*, 1979) resact y speract, respectivamente, son los dos SAPs mejor caracterizados con propiedades quimioatrayentes y esta propiedad, como la RA, depende de Ca^{2+} . El speract induce fluctuaciones de Ca^{2+} en los flagelos de espermatozoides de *S. purpuratus* (Kaupp *et al.*, 2003) y de *L. pictus* (Granados-González *et al.*, 2005), las cuales también se han observado en *A. punctulata* y en la estrella de mar *Asterias amurensis*, en respuesta a sus respectivos quimioatrayentes, resact y asterosap (Bohmer *et al.*, 2005). En poblaciones de espermatozoides de *A. punctulata*, resact induce un aumento de Ca^{2+} bifásico, de los cuales el primero está mediado por GMPc y el segundo por AMPc (Kaupp *et al.*, 2003). En el mismo trabajo, pero utilizando células individuales, mostraron que las espigas de Ca^{2+} en los flagelos provocan que los espermatozoides giren (Kaupp *et al.*, 2003) y sugirieron que tanto el aumento en AMPc como el segundo aumento en el Ca^{2+} podrían estar

involucrados en la adaptación de los espermatozoides al quimioatrayente (Kaupp *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que CatSper (el canal iónico específico del espermatozoide) media la afluencia de Ca^{2+} evocada por el quimioatrayente y controla la dirección quimotáctica; así como que la alcalinización concomitante producida por speract funciona como un mecanismo cooperativo que le permite a CatSper transformar los cambios periódicos de voltaje en ráfagas de Ca^{2+} (Espinal-Enríquez, *et al.*, 2017; Seifert *et al.*, 2015). Además, como ya mencionamos, el aumento de pH_i disparado por speract también estimula a la SUsAC, aumentando los niveles de AMPc, que a su vez regulan a CatSper. Debido a lo anterior, se esperaría que los inhibidores de la sAC y/o ACm actuaran de igual forma al menos parcialmente en la quimiotaxis. En *Ciona intestinalis* los resultados de experimentos con KH7 sugieren que la sAC participa en la frecuencia del batido flagelar y la quimiotaxis dependiente del factor del óvulo, SAAF o factor activador y atrayente del espermatozoide (Shiba e Inaba, 2014).

7.2 La vía de señalización del speract

Con base en los resultados de experimentos hechos a lo largo de más de 35 años por diferentes grupos (revisado en Espinal-Enríquez *et al.*, 2017; García-Rincón *et al.*, 2016), el modelo propuesto para la vía de señalización disparada por el speract es la siguiente: la unión del speract a su receptor (Cardullo *et al.*, 1994), acoplado a la guanilil ciclase (GC) en la membrana del flagelo del espermatozoide, eleva los niveles de GMPc, que abre el canal iónico de K^+ Tetra-KCNG, produciendo una salida de K^+ y una hiperpolarización (el E_m disminuye, es decir, se hace más negativo) transitoria del espermatozoide (Galindo *et al.*, 2000; Lee y Garbers, 1986). Dicha hiperpolarización activa al intercambiador Na^+/H^+ , elevando el pH_i (Lee, 1985; revisado en Nishigaki *et al.*, 2014), lo cual estimula la AC soluble (SUsAC) y aumenta los niveles de cAMP (revisado en Vacquier *et al.*, 2014),

la ATPasa dineína (Christen *et al.*, 1983), la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I, asociada a la membrana externa de la mitocondria (Bezair *et al.*, 2004), el canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide, CatSper (el más complejo de los canales iónicos conocidos y cuya ausencia causa infertilidad en ratones) (Chung *et al.*, 2017; Espinal-Enríquez *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2001; Seifert *et al.*, 2015) y la fosfolipasa A2 (PLA2; Mita *et al.*, 1991; Mita y Ueta, 1990) para alimentar la β -oxidación (Eaton *et al.*, 1996) y aumentar los ácidos grasos libres (FFA, Jezek *et al.*, 1998) que entran a la mitocondria, respectivamente. Lo anterior incrementa los niveles de NADH que transfiere sus electrones a la cadena de transporte de electrones (CTE), estimulando el consumo de oxígeno y generando el cambio en el potencial de membrana mitocondrial (Emit, fig. 2) utilizado por la F₀F₁-ATP sintasa para la síntesis de ATP. La hiperpolarización inicial disparada por el speract y el aumento en los niveles de AMPc sintetizado por la SUsAC abre el canal de Na^+ , SpHCN produciendo una entrada de Na^+ y una despolarización del espermatozoide. Esta despolarización, junto con los aumentos en AMPc, activa el canal CatSper que induce oscilaciones de Ca^{2+} en el flagelo de la célula. Finalmente, las dineinas hidrolizan el ATP en concierto con las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para regular el nado del espermatozoide (la movilidad y la quimiotaxis) (modificado de García-Rincón *et al.*, 2016).

El uso del inhibidor específico de la sAC, KH7, nos permitió demostrar que dicha enzima participa de manera importante en la movilidad de los eem (Vacquier *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con el hecho de que los espermatozoides de ratones nulos para la sAC no fecundan a los óvulos *in vitro* debido a que las células no se mueven (Esposito *et al.*, 2004). Además, el espermatozoide inmóvil recupera la movilidad cuando se expone a análogos permeables de AMPc (Wang *et al.*, 2003), confirmando que la sAC está involucrada en la generación del AMPc necesario para la movilidad de los espermatozoides de ratón. También en *C. intestinalis* existe evidencia funcional de la participación de ACm en la activación de la movilidad flagelar basal mediada por PKA (Shiba e Inaba, 2014).

8. El AMPc y la fosforilación de proteínas dependiente de PKA en la movilidad y en la RA del eem

La fosforilación reversible de proteínas es una modificación postransduccional reconocida como el mecanismo principal para el control de eventos intracelulares en células eucariotas, y en el espermatozoide se ha propuesto como un mecanismo de regulación de gran importancia en la bioenergética mitocondrial (Mizrahi y Breitbart, 2014). Como se mencionó antes, uno de los blancos principales del AMPc es la proteína cinasa dependiente de AMPc o “PKA”, que fosforila proteínas y regula su actividad. En células eucariotas, la PKA es una de las primeras cinasas descubiertas y mejor caracterizadas (Walsh *et al.*, 1968), y es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C), con cuatro tipos diferentes de subunidades R (RI α , RI β , RII α y RII β) y cuatro tipos diferentes de subunidades C (Ca, C β , C γ y PrKX) (Taylor *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 1999).

La PKA fue la primera proteína cinasa que se identificó en eem (Garbers y Kopf, 1980; Garbers *et al.*, 1980; Lee y Iverson, 1976) y desde esa época se sabe que cuando la concentración de AMPc aumenta, la PKA se activa, ciertas proteínas del axonema del flagelo se fosforilan y se inicia la movilidad flagelar, la cual se mantiene hasta que el espermatozoide se fusiona con el óvulo (Garbers y Kopf, 1980; Garbers, 1989).

Se ha propuesto que cambios en el estado de fosforilación de las ~250 proteínas que conforman el axonema (Inaba, 2003) regulan la movilidad de los espermatozoides, debido a aumentos en los niveles de AMPc y de calcio (Tash, 1989, revisado en Darszon *et al.*, 2008), aunque muy pocas se han identificado a nivel molecular.

En eem, la PKA (fig. 3 y González-Mora, 2016), como las ACs (Beltrán *et al.*, 2007a; Vacquier *et al.*, 2014), se distribuyen a lo largo del espermatozoide. En este modelo inicialmente encontraron que la axoquinina (proteína del axonema del flagelo) se fosforila de manera dependiente de los niveles de AMPc cuando la movilidad de los espermatozoides se activa con ATP (Tash

et al., 1986). También identificaron una RII de la PKA (Paupard *et al.*, 1988) y a CaM (Tash y Means, 1982) como proteínas fosforiladas asociadas a la movilidad de los espermatozoides. Posteriormente, la exposición de los espermatozoides intactos a diferentes condiciones iónicas para mantenerlos inmóviles o móviles, permitió observar que la activación de la movilidad aumentaba la fosforilación de sólo cuatro proteínas del flagelo (32, 45, 130 y 500 kDa), las cuales podrían ser subunidades de la ATPasa dineína, considerando sus propiedades de solubilidad (Bracho *et al.*, 1998).

El aumento en el pH_i , disparado por la unión del speract a su receptor, inactiva a la GC defosforilando su sitio catalítico (Ward *et al.*, 1985) y aumenta la actividad de FDE5 (Su y Vacquier, 2006), la cual es accionada por GMPc (Rybalkin *et al.*, 2003), así como por fosforilación mediada por PKA cuando los eem se exponen a EJ, inductor natural de la RA (Su y Vacquier, 2006).

Existen evidencias de que los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (Cav) también se controlan por fosforilación mediada por diferentes cinasas (revisado en Darszon *et al.*, 2011), entre las que se encuentra la PKA (Catterall, 2016). El uso de anticuerpos comerciales contra Cavs de rata (anti-CavPan, anti-Cav1.2 y anti-Cav2.3) y experimentos de inmunofluorescencia nos permitieron demostrar que los Cav1.2 y Cav2.3 se encuentran distribuidos diferencialmente en los flagelos y en las áreas de la mitocondria y del acrosoma de eem *S. purpuratus* (Granados-González *et al.*, 2005). Con los mismos anticuerpos y experimentos de WB corroboramos que dichos canales están en las membranas de flagelo de los espermatozoides; además, advertimos que los antagonistas de canales Cav, nifedipina y nimodipina, que inhiben la RA, reducen el aumento intracelular de Ca^{2+} inducido por una despolarización provocada por K^+ en espermatozoides de *L. pictus* tratados con el ionóforo de K^+ , valinomicina. Lo anterior sugiere que los canales Cav1.2 y Cav2.3 podrían participar en la RA y/o en la movilidad del eem (Granados-González *et al.*, 2005). Está reportado que la inducción de la RA de los eem con EJ incrementa

la actividad de AC, de AMPc y de fosforilación mediada por la PKA (Su *et al.*, 2005). En ese trabajo, el uso del inhibidor de PKA, H89, de un análogo permeable de AMPc y del inhibidor de FDEs, IBMX, hizo posible demostrar que la PKA es necesaria para que la RA se lleve a cabo. Estos resultados concuerdan con la distribución de la PKA en los eem que, a diferencia de lo reportado para los espermatozoides de ratón (Wertheimer *et al.*, 2013), también se encuentra en la cabeza (fig. 3). Además, mediante un anticuerpo que detecta sustratos fosforilados por PKA (anti-PKAs) y espectroscopía de masas (MS/MS), reconocieron seis proteínas fosforiladas por dicha enzima al exponer a los espermatozoides a EJ, entre las que se encuentran la PDE5 (específica para GMPc) y/o PDE11, que degrada tanto AMPc como GMPc. Sabemos que el AMPc está involucrado en todas las funciones importantes del eem, como la movilidad, la quimiotaxis y la RA, y que el GMPc participa en la movilidad y en la quimiotaxis de esta célula. También identificaron una adenilato cinasa (AK), que puede ser la AK1 o la AK5. La actina fue otra de las proteínas identificadas, que sabemos se polimeriza durante la RA. Otra proteína encontrada fue la creatina cinasa (CK), proteína estructural unida tanto a la membrana del flagelo como al axonema, y en eem existe la hipótesis de que participa en una lanzadera de fosfo-creatina, re-fosforilando el ADP producido por las dineínas para restablecer el ATP. De hecho, en eem, este es el mecanismo propuesto para el transporte del ATP, 40 μm desde la mitocondria (fig. 2), donde se produce hasta el final del flagelo (Wothe *et al.*, 1990). Finalmente, también identificaron a EPS8, sustrato de la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Su *et al.*, 2005).

Más recientemente demostramos que existe una fosforilación diferencial de algunos sustratos de PKA y de PKC asociados a las BL aisladas (ver proteínas identificadas en sección 9.2. Las balsas lipídicas [BL] en los eem), a partir de espermatozoides de *S. purpuratus* en diferentes condiciones de movilidad: inmóviles, móviles y estimulados por speract (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere que algunas proteínas mitocondriales reguladas

por PKA y por PKC pueden influir en la movilidad del eem (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Estos resultados concuerdan con el hecho de que la unión del speract a su receptor despolariza la mitocondria del espermatozoide mediante el aumento de pH disparado por el péptido, lo cual, junto con el incremento de Ca^{2+} , modula el metabolismo mitocondrial para regular la movilidad (García-Rincón *et al.*, 2016).

8.1 La PKA y las AKAPs

Diferentes proteínas de andamiaje para cinasas A (AKAPs) tienen una función dual, como anclas de PKA a diferentes ubicaciones subcelulares cercanas a los sustratos de PKA para fosforilarlos selectivamente, y como andamios para los señalosomas con proporciones diferentes de PKA, ACs, fosfatasas, otras cinasas, Epac, PDEs y CaM, entre otras proteínas efectoras (Aggarwal-Howarth y Scott, 2017; Maurice *et al.*, 2014; Scott y McCartney, 1994). Los señalosomas son complejos de señalización/regulación multimoleculares localizados en sitios intracelulares específicos que agrupan moléculas de señalización, reguladoras y efectoras, donde facilitan la compartimentalización de vías de señalización de nucleótidos cíclicos y funciones celulares específicas (Ahmad *et al.*, 2015; Monterisi y Zaccolo, 2017). En el espermatozoide la localización de las AKAPs es crítica, dado que es una célula altamente compartimentalizada, donde participan en la movilidad, la capacitación y la RA (Carr y Newell, 2007; Vize *et al.*, 2015). En este sistema se han detectado diferentes AKAPs, entre las que se encuentran AKAP1 –inicialmente llamada AKAP8- que ancla a PKAII α a las mitocondrias en el flagelo del espermatozoide; AKAP3 (Amaral *et al.*, 2014; Vize *et al.*, 2015), también llamada AKAP110 (Carr *et al.*, 2001); AKAP4 o AKAP82 (Ben-Navi *et al.*, 2016); AKAP8, que ancla PKA al núcleo del espermatozoide AKAP11; AKAP220, MAP2 otra AKAP que participa en la regulación de capacitación y/o la reacción acrosomal (revisado en Carr y Newell, 2007), y RSP3 (AKAP, llamada así por sus siglas en inglés para radial spoke protein; Gaillard *et al.*, 2001; Smith y Yang, 2004).

Mediante análisis proteómico (MS/MS) de solubilizados de espermatozoides de *S. purpuratus* pasados por una columna de Co^{2+} o por columnas de afinidad de lectinas (concanavalina A o aglutinina de germen de trigo (WGA) unidas a agarosa, identificamos 6, 11 y 12 péptidos únicos, respectivamente, de la proteína SpRSP (gi|2905895; 63kDa) del axonema (Beltrán, inédito). Además, en una banda de proteína de una muestra de flagelos separada en un mini gel desnaturizante de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PA-SDS) en la cual se detectó la PKA mediante WB, se identificaron por MS/MS 13 péptidos únicos de SpRSP1 (gi|780158049; 31 kDa) y 11 de SpRSP9 (gi|115733045) (González-Mora, 2016). En la misma banda detectada con anti-PKA, pero en un experimento diferente, también identificamos cinco péptidos únicos de la isoforma X1 de SpRSP3 (gi|72009354; 45 kDa), la cual tiene alta identidad (67%) y homología (84%) con la AKAP de espermatozoides de humano (Q86UC2; RSPH3_HUMAN), que corresponde a AKAP4 (González-Mora, 2016).

En espermatozoides de mamífero se ha propuesto que AKAP110 podría actuar como andamio de la fosfatasa PP1 de Serina/Treonina y de Rho, una proteína G pequeña, así como de su efector RHOK (cinasa de Serina/Treonina) (Carr *et al.*, 2001). También mediante análisis proteómico (MS/MS) de muestras de eem *S. purpuratus* identificamos a la PP1 (Beltrán, inédito), y está reportado que tanto Rho (que regula procesos celulares basados en actina), como su efector RHOK, participan en la RA del eem (Castellano *et al.*, 1997; Urióstegui *et al.*, 2007). Lo anterior sugiere la participación de AKAPs en el eem. Existe un modelo donde proponen que el par central de microtúbulos del axonema distribuye las señales químicas a RSP, los cuales modifican el estado de fosforilación de las proteínas del axonema para activar/inactivar brazos de dineína particulares que promuevan un deslizamiento coordinado de los microtúbulos en el axonema (revisado en Yoshimura *et al.*, 2007).

9. Las ACs en plataformas de señalización/balsas lipídicas

9.1 Las balsas lipídicas (BL)

Los microdominios en membranas nativas, también conocidos como BL o “Lipid Rafts”, “LD-DIM” (membranas de baja densidad insoluble en detergente), DRM (membranas resistentes a detergentes) o DIGs (dominios insolubles en detergentes ricos en glicolípidos, por sus siglas en inglés), se definen como plataformas de señalización enriquecidas en esfingolípidos, colesterol y proteínas de señalización resistentes a la extracción con detergentes no iónicos en frío (Pike, 2004). Las balsas lipídicas (BL) son microdominios lineales (200-500 nm; Gheber y Edidin, 1999) que incluyen a las caveolas, invaginaciones de la membrana plasmática (50-100nm) en forma de matraz enriquecidas con la proteína caveolina, una proteína de andamiaje (Lisanti *et al.*, 2004; Martens *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2008).

Por muchos años la existencia de las BL ha sido un punto de controversia en términos de tamaño, estabilidad e importancia fisiológica (Edidin, 2003; Munro, 2003). Sin embargo, el uso de diferentes estrategias como técnicas bioquímicas, sondas fluorescentes, visualización por microscopía, enfoques funcionales (como la investigación del efecto de la destrucción de las BL en la función, por ejemplo, de canales iónicos; revisado en Dart, 2010), la aparente habilidad de dichos microdominios para agregar selectivamente moléculas de señalización que interactúan entre sí y la implicación de que podrían estar involucrados en la organización espacio-temporal de vías de señalización celulares (Patel *et al.*, 2008; Simons y Toomre, 2000), son evidencia de que dichos microdominios existen y que son esenciales en la fisiología de las células.

9.2 Las BL en los eem

En los eem de tres especies (*H. pulcherrimus*, *S. purpuratus* y *Anthocidaris crassispina*) se aislaron y caracterizaron por primera vez BL de un gameto

(Ohta *et al.*, 1999). Esto se hizo solubilizando los espermatozoides con 1% de Triton-X100 a 4° y separando la BL en un gradiente de sacarosa (Ohta *et al.*, 1999). Posteriormente también Ohta y colaboradores (Ohta *et al.*, 2000), mediante experimentos de “Western blot” (WB), identificaron en las BL de eem *S. purpuratus* el receptor del speract, el receptor de la gelatina (SuREJ1), una proteína de 63 kDa (anclada a glucosil-fosfatidil inositol-GPI, marcador de BL), la subunidad α de la proteína G heterotrimérica estimuladora ($G_{s\alpha}$), la adenil ciclasa (que, como se supo posteriormente, corresponde a la sAC; revisado en Vacquier *et al.*, 2014), la guanil ciclasa (GC) y la PKA. Además, como observaron que el receptor del speract, la proteína de 63 kDa anclada a GPI y la $G_{s\alpha}$ co-inmunoprecipitan, propusieron que dicha BL podría ser el sitio de interacción del speract con su receptor, así como de la vía de señalización subsecuente involucrada en la inducción de la respiración, la movilidad y posiblemente en la reacción acrosomal del eem (Ohta *et al.*, 2000).

Los flujos iónicos son esenciales en la fisiología del espermatozoide y existen evidencias de que las BL regulan la función de canales iónicos de diferentes maneras, ya sea por interacciones directas proteína-lípido o alterando las propiedades físicas de la bicapa lipídica (Dart, 2010). Dado que hay controversia respecto de la existencia de BL y se ha sugerido que dichas balsas podrían ser artefactos de la solubilización con detergentes (Chamberlain, 2004), Esperanza Mata-Martínez (2010) en su tesis de licenciatura se dio a la tarea de obtener BL por tres estrategias diferentes (detergente no iónico, sonicación y sonicación/pH alcalino) y mediante experimentos de WB, confirmando en ellas la presencia de la $G_{s\alpha}$, la PKA y la SUsAC. Además, demostró que dichas BL también contienen dos isoformas de adenilil ciclasas transmembranales (ACm2 y ACm9), los canales iónicos TetraKCNG, Cav1.2 y SpHCN y la flotilina 2, proteína de 45 kDa y marcador de BL, que puede estar o no en caveolas (Banning *et al.*, 2011). En las BL del eem obtenidas solubilizando con 1% de Triton X100 no se encontró caveolina, aunque sabemos que el espermatozoide de esta

especie la contiene (Mata-Martínez, 2010). Existe evidencia (bioquímica, de microscopía y funcional) de que prácticamente todos los tipos de canales iónicos están asociados a BL (Martens *et al.*, 2000, revisado en Dart, 2010), lo cual apoya nuestros resultados. Posteriormente Miriam Cerrillos, en su tesis de licenciatura (Romero, 2013), demostró que las BL de flagelos aislados también contienen ACm2 y ACm9, confirmando la presencia de dichas enzimas en el flagelo, como lo muestran experimentos de inmunofluorescencia (Beltrán *et al.*, 2007a). En el mismo trabajo se mostró que la desestabilización de las balsas lipídicas de eem *S. purpuratus* con el desensamblador de BL, metil- β -ciclodextrina (M β C), inhibe ~90% la reacción acrosomal (RA) y estimula ~20% la movilidad de los espermatozoides (Romero, 2013). El hecho de que las BL de *C. intestinalis* participan en la señalización de Ca^{2+} , responsable de la activación de la movilidad y de la quimiotaxis del espermatozoide (Zhu e Inaba, 2011), apoya los resultados en eem.

Como mencionamos en la sección VIII, buscando proteínas cuyo patrón de fosforilación cambia con la movilidad del espermatozoide, se aislaron BL de eem inmóviles, móviles y estimulados con el regulador de la movilidad speract (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Las proteínas se separaron en mini geles de dos dimensiones (2-D) y mediante WB se analizaron las proteínas con anticuerpos específicos contra sustratos fosforilados por PKA (anti-sPKA) o por PKC (anti-sPKC) para su identificación a nivel molecular por espectroscopía de masas (MS/MS) (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Lo anterior se hizo en BL derivadas, tanto de células completas como de flagelos aislados. Es interesante que en el primer caso (BL de eem) sólo una mancha detectada con anti-sPKA y 3 con anti-sPKC cambiaron el nivel de fosforilación con la movilidad y que en la mancha detectada con anti-sPKA (tabla 1) se identificaran principalmente proteínas mitocondriales: ATP-sintasa, creatina cinasa, NADH deshidrogenasa (ubiquinona), flavoproteína 2, succinil-CoA ligasa y el canal aniónico dependiente de voltaje 2 (VDAC-2), además de las proteínas PKA RII, la cadena β de la tubulina y la actina

Cy I (tabla 1 y Loza-Huerta *et al.*, 2013). Por el contrario, en las BL derivadas de los flagelos aislados se detectaron 16 manchas con anti-sPKA (tabla 2), de las cuales se identificaron 22 sustratos (tabla 2) y sólo una mancha con anti-sPKC (Loza-Huerta, 2013). Entre los sustratos de PKA identificados están el receptor del speract, la FDE5, la fosfatasa 1A (PP1A), la PKA RII, la flotilina (marcador de BL) y proteínas del axonema, entre otras (tabla 2). Este trabajo sugiere que la SUsAC, la PKA y la PKC participan en la movilidad de los eem cambiando los niveles de fosforilación de algunas proteínas y que la PKA y la PKC muestran una comunicación cruzada en este evento (Loza-Huerta, 2013). Interesantemente, mediante análisis proteómico (MS/MS) de una banda de proteína de muestra de flagelos detectada con anti-SUsAC (Mr ~190 kDa), identificamos 57 péptidos únicos del canal iónico tetraKCNG (gi | 126506318), tres de la FDE de GMPc (gi | 780164106), siete de CatSperγ (gi | 780129264) y dos del canal SpHCN (gi | 74136757), lo cual sugiere que la SUsAC interactúa de manera directa o indirecta con alguna(s) de éstas en la membrana del eem, confirmando los resultados obtenidos en BL de dicho espermatozoide (Beltrán, inédito). Además, en otra banda de proteína de la misma muestra de flagelos, pero detectada con anti-PKA, encontramos 10, nueve y seis péptidos únicos de la fosfatasa Ser/Treo PP1 (gi | 780178928), en tres preparaciones diferentes, respectivamente, y en una de las preparaciones mencionadas seis péptidos únicos de la fosfatasa PPA2 (gi | 115675671) (Beltrán, inédito). Estos resultados contribuyen de manera relevante a entender cómo se regula la movilidad de los eem. El hecho de haber identificado proteínas mitocondriales como sustratos de PKA y de PKC confirma la participación de este organelo en la fecundación (Ardón *et al.*, 2009; García-Rincón *et al.*, 2016). También se han descrito BL en espermatozoides de mamífero (Treviño *et al.*, 2001) y se les ha implicado en la capacitación (Cross, 2004; Sleight *et al.*, 2005; Travis *et al.*, 2001) y en la interacción espermatozoide-zona pelúcida del óvulo (Miranda *et al.*, 2009; Zitrandski *et al.*, 2010).

9.3 El speract modifica el patrón de fosforilación de sustratos de PKA y/o de PKC en BL de eem

Como recordaremos, el receptor del speract está acoplado a una guanilil ciclasa de membrana (GCm) en el flagelo del espermatozoide, cuya actividad se regula tanto por cambios en su estado de fosforilación como de pH_i inducidos por la unión del speract a su receptor (Bentley *et al.*, 1986; Ramarao y Garbers, 1985; Suzuki y Garbers, 1984; Ward *et al.*, 1985). Para investigar si el speract provoca cambios en la fosforilación de otras proteínas, además de la GCm, en condiciones parecidas a las fisiológicas, los eem se expusieron durante 10 segundos a diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10 nM) de speract en el agua de mar (Loza-Huerta, 2013). El análisis de las proteínas de los espermatozoides expuestos a dichas condiciones mediante experimentos de WB y anticuerpos específicos anti-PKAs o anti-PKCs, que detectan sustratos fosforilados por PKA o PKC respectivamente, mostró que en condiciones basales de movilidad, la PKA fosforila seis sustratos con una PM de ~180, 120, 80, 70, 50 y 45 kDa, y que la estimulación con speract modifica de manera diferencial los patrones de fosforilación de dichas proteínas. En general se observó una disminución en la fosforilación de los sustratos de PKA, excepto en las bandas de 120 y 80 kDa, cuya fosforilación aumentó con 10 nM de speract y la de 45 kDa que aumentó con 1 nM de speract. De manera similar, el speract también modificó el grado de fosforilación de diferentes sustratos de PKC (Loza-Huerta, 2013). Los resultados anteriores sugieren que durante el nado de los espermatozoides hacia el óvulo, el gradiente de speract modifica de manera dosis-dependiente la fosforilación de los sustratos de PKA y de PKC. Un análisis *in silico*, mediante el programa NetPhosK, indica que la mayoría de las proteínas que participan en la cascada de señalización del speract tienen sitios posibles de fosforilación tanto por la PKA (GCm, FDE específica para GMPc, tetraKCNG, Cav [Catterall, 2016], ACm6, SUsAC y SpHCN), como por la PKC (GCm, tetraKCNG, NHE, Cav [Catterall, 2016], CatSper, ACm2 y sAC) (Loza-Huerta, 2013).

En *S. purpuratus* se clonaron dos canales iónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN), SpHCN1 (Gauss *et al.*, 1998) y SpHCN2 (Galindo *et al.* 2005), y ambos se detectaron en el flagelo del espermatozoide (Galindo *et al.*, 2005; Gauss *et al.*, 1998). El análisis de la secuencia de SpHCN2 muestra que tiene varios sitios posibles de fosforilación: dos por PKA (S⁵⁴ y S⁸²), cinco por PKC (T⁶⁰, S¹⁰⁴, S²⁰⁴, S³⁸⁵ y T⁴⁰⁹) y uno por tirosina cinasa, y que el dominio de unión de nucleótidos es de 135 aminoácidos, el cual tiene 44% de identidad con el de SpHCN1 (Galindo *et al.*, 2005). Un canal similar al SpHCN1 que se activa directamente por AMPc y es tres veces más selectivo para K⁺ que para Na⁺, se estudió en eem hinchados mediante experimentos de Patch-clamp (Sánchez *et al.*, 2001). Dada su selectividad, en condiciones fisiológicas, cuando el canal se abre el sodio entra despolarizando la célula, lo cual sugiere su participación en la respuesta del espermatozoide posterior a la hiperpolarización inicial disparada por el speract. Como los canales HCN están involucrados en la periodicidad en otros tipos celulares, se ha propuesto que en el eem podría modular el batido flagelar y participar en la quimiotaxis (Kaupp y Seifert, 2001).

En ausencia de síntesis de proteínas, como en el espermatozoide, la fosforilación se vuelve un mecanismo importante para regular la función de muchas proteínas. Por lo tanto, los resultados mencionados indican que las proteínas que participan en la movilidad estimulada con el speract modulan su función por cambios en su estado de fosforilación inducidos por la PKA y/o por la PKC.

Además, los resultados de experimentos de inmunoprecipitación e identificación por espectroscopía de masas mostraron que la SUsAC forma complejos con al menos 10 proteínas de la membrana plasmática y del axonema del eem (Nomura y Vacquier, 2006): el intercambiador Na⁺/H⁺ específico del espermatozoide, dos cadenas pesadas de dineínas (la 7 y la 9), el canal iónico SpHCN, la GCm, la FDE5, la CK, el receptor del speract y β -tubulinas. Estos resultados llevaron al grupo a proponer que las proteínas asociadas a la

SUsAC podrían ser importantes en unir la señalización de la membrana plasmática a la utilización de energía en la regulación de la movilidad del espermatozoide (Nomura y Vacquier, 2006). Además, en el caso del ratón, el sNHE tiene un sitio de unión putativo para nucleótidos cíclicos (Wang *et al.*, 2003). Esto último, junto con el hecho de que la SUsAC y el sNHE se encuentren interactuando en esta célula, sugiere que el AMPc regula al sNHE. También es importante recordar que la eliminación independiente de los genes que codifican para la sAC (Esposito *et al.*, 2004) o el sNHE causan infertilidad en los ratones, debido a defectos severos en la movilidad de los espermatozoides (Wang *et al.*, 2003), lo cual pone de manifiesto la importancia de ambas proteínas en la fisiología del espermatozoide.

10. ¿La sAC, PKA y Epac están en la mitocondria del eem?

En células somáticas se han encontrado más de 60 fosfoproteínas mitocondriales (Pagliarini y Dixon, 2006), lo que sugiere que la fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo importante en la actividad mitocondrial (Deng *et al.*, 2011; Pagliarini y Dixon, 2006). Se ha reportado que el AMPc sintetizado dentro de la mitocondria regula la fosforilación oxidativa (Acin-Pérez *et al.*, 2010; Valsecchi *et al.*, 2014) y aunque inicialmente se dudaba de la presencia de la AC y de la PKA dentro de la mitocondria, hay evidencias de que la vía de señalización completa CO_2 - HCO_3 -sAC-AMPc-PKA está en el interior mitocondrial de células somáticas (Acin-Pérez *et al.*, 2010; Valsecchi *et al.*, 2014).

El eem posee sólo una mitocondria (fig. 2), responsable de generar la mayor parte de la energía (en forma de ATP) que la célula necesita para nadar hacia el óvulo y fecundarlo (revisado en García-Rincón *et al.*, 2016). Sabemos que la estimulación de los eem *S. purpuratus* con agentes que afectan la función mitocondrial por diferentes mecanismos aumentan el Ca^{2+} mitocondrial (Ardón *et al.* 2009) y que el speract, mediante el incremento de pH_i , despolariza la mitocondria (disminuye su Emit) y eleva los niveles de NADH,

independientemente de Ca^{2+} externo (García-Rincón *et al.*, 2016). Además, como se mencionó antes, el ATP es esencial para que las dineínas (motores del flagelo) funcionen y el espermatozoide nade (revisado en Nishigaki *et al.*, 2014). Todo lo anterior pone de manifiesto la importancia que tiene la única mitocondria (fig. 2) del eem en la movilidad del espermatozoide y en la fecundación.

Como ya se dijo, la SUsAC se distribuye a lo largo del espermatozoide y anticuerpos específicos contra la enzima marcan de manera particular el área de su mitocondria (Beltrán *et al.*, 2007a; Vacquier *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, Juan Pablo González-Mora (2016), en su tesis de licenciatura, se preguntó si la SUsAC está en la mitocondria del eem; en ese trabajo se mostró –mediante anticuerpos específicos y experimentos de WB– que la SUsAC y la PKA se encuentran en las fracciones de mitocondrias aisladas en gradientes de densidad, a partir de eem *S. purpuratus*, y el análisis proteómico de dichas fracciones corroboró la presencia de ambas enzimas en los mencionados organelos. Además, experimentos de inmunofluorescencia nos permitieron mostrar que la PKA (fig. 3), al igual que la SUsAC (Beltrán *et al.*, 2007a), se distribuye a lo largo del espermatozoide de *S. purpuratus*, marcando también las áreas del acrosoma y de la mitocondria. Los resultados preliminares de microscopía electrónica de transmisión corroboraron la presencia de la SUsAC en la mitocondria del eem. Lo anterior apoya el hecho de que tanto la SUsAC como la PKA se encuentran en la mitocondria del eem (González-Mora, 2016), como se mostró de forma funcional (para la sAC) y mediante microscopía electrónica (en el caso de PKA) en los espermatozoides de toro (Mizrahi y Breitbart, 2014), desde donde podrían modular la movilidad y la reacción acrosomal, funciones esenciales del espermatozoide.

Finalmente, según se indicó antes, otro de los blancos de AMPc son las Epac, proteínas multidominio cuya región catalítica C-terminal posee un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) específico para las GTPasas pequeñas Rap1 y Rap2. Epac cataliza la conversión de Rap1 y Rap2 de una forma inactiva (Rap-GDP) a una activa (Rap-GTP) (De Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Las Epac regulan un sinnúmero de procesos celulares en diferentes

tejidos (revisado en Lewis *et al.*, 2016), que incluyen adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, además de regulación de intercambiadores como la isoforma 3 del Na^+/H^+ (NHE; Honegger *et al.*, 2004), canales iónicos (Zhang *et al.*, 2009) y señalización mediada por Ca^{2+} (Kang *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2013). Hay evidencia de la participación de Epac en diferentes eventos importantes para la fecundación en espermatozoides de mamíferos (Miro-Moran *et al.*, 2012). En la cabeza de los de ratón se identificó la vía de señalización AMPc-Epac (Amano *et al.*, 2007) y se demostró que Epac está involucrada en el batido flagelar de los espermatozoides de hámster (Kinukawa *et al.*, 2006). Además, mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-Epac, generado en conejo contra el péptido sintético LREDNCHFRLVDK (Branham *et al.*, 2006), cuya secuencia es idéntica en las dos isoformas de humano, correspondiente a los residuos 285-297 de Epac1 (De Rooij, *et al.*, 1998) y 438-450 de Epac2 (Ueno *et al.*, 2001). Ruete *et al.* (2014) demostraron que Epac participa en la reacción acrosomal de los espermatozoides de humano. El genoma de *S. purpuratus* contiene la secuencias predichas de dos isoformas de Epac2: SpEpac2 X1 (XP_011668470.1, peso molecular calculado [PMc]=103119 Da) y SpEpac2 X2 (XP_784278.3, PMc=102075 Da), las cuales tienen identidades de 56 y 57% y homologías de 73 y 74%, respectivamente,³ con Epac2 de humano (Q8WZA2), también conocida como factor de intercambio 4 de nucleótidos de guanina de Rap. Dado que la secuencia del epítipo para generar el anticuerpo contra las Epac1/2 de humano (Branham *et al.*, 2006; Ruete *et al.*, 2014) está altamente conservada (12/13 aminoácidos) en las dos isoformas de SpEpac2 (X1 y X2), utilizamos dicho anticuerpo⁴ y mediante experimentos de WB detectamos una banda de ~100 kDa tanto en membranas de flagelos (Beltrán, inédito) como en la fracción mitocondrial del eem *S. purpuratus* (González-Mora, 2016), la cual podría corresponder a cualquiera de las dos isoformas (X1 o X2) de SpEpac2. Además, encontramos que un inhibidor selectivo para Epac (Nebenfuhr, 2002),

³ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP_7668_10728&LINK_LOC=blastta&LAST_PAGE=blastx&QUERY=%09095398

⁴ Donado amablemente por la Dra. Claudia Tomes, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Brefeldina A (200 μ M), disminuye (~5-8%) poco pero significativamente la velocidad de nado circular de los espermatozoides de la misma especie (Loza-Huerta, 2013). Aunque faltan experimentos por hacer, los resultados anteriores sugieren que Epac está en el flagelo y en la mitocondria del eem *S. purpuratus*, como se ha propuesto en otros sistemas (Valsecchi *et al.*, 2014), y que dicho blanco de AMPc (Epac) también participa en la fisiología del eem.

11. Comentario final

Es claro que el AMPc es indispensable para las funciones esenciales del espermatozoide de erizo de mar (movilidad, quimiotaxis y reacción acrosomal) y que para cumplir con su tarea necesita tener fuentes de producción (ACs) distribuidas estratégicamente en toda la célula. Sin embargo, dado que su acción depende de una regulación de la localización espacio-temporal altamente precisa, es fundamental que tanto las ACs como las FDEs que hidrolizan el AMPc se desempeñen en el instante y lugar donde se necesitan. Para esto, es indispensable que las proteínas que regulan a cada una de las ACs (Canales iónicos de Ca^{2+} , CaM, PKA, PKC, proteínas G heterotriméricas, NHE, fosfatasas, receptores acoplados a proteína G (GPCR) etcétera) (sAC y ACm) y a las FDE de AMPc operen en sintonía. Sabemos que tanto las ACs como las FDEs (Francis *et al.*, 2011; Maurice *et al.*, 2014) se relacionan con diferentes juegos de proteínas en distintos microdominios de membrana; sin embargo, también podrían asociarse, como en los mamíferos, en diferentes señalosomas (ver sección VIII.1). Para tener un mejor entendimiento de los mecanismos de acción del AMPc en la fisiología del espermatozoide, es determinante identificar a las proteínas con las cuales interactúan las diferentes ACs formando complejos, no sólo en la membrana sino en el interior de la célula. La proteómica subcelular además de mostrarnos qué proteínas están dentro de las células, nos ayuda a comprender en dónde residen. Falta un largo camino por recorrer y experimentos por hacer para desentrañar la diversidad y complejidad de la señalización del AMPc en el espermatozoide.

Tabla 1. Sustratos de PKA en BL de espermatozoides de *S. purpuratus*, cuyo patrón de fosforilación cambia con la movilidad

Proteína	No. Acceso	NTP	NPU
Actina Cy 1 citoplásmica	gi 72167348	4	3
Creatina Cinasa	gi 7254204	22	12
Subunidad β de succinil CoA ligasa	gi 72015065	20	8
Subunidad β de tubulina	gi 72065171	11	5
Subunidad regulatoria II de PKA	gi 47551027	14	6

Proteínas identificadas por MS/MS en una mancha detectada en geles 2-D mediante experimentos de WB con el anticuerpo anti-PKAs. NPT: Número de péptidos totales; NPU: Número de péptidos únicos. Modificada de Loza-Huerta, 2013.

Tabla 2. Sustratos de PKA en BL de flagelos aislados de espermatozoides de *S. purpuratus*, cuyo patrón de fosforilación cambia con la movilidad

Mancha	Proteína	No. acceso	NTP	NPU
1	Cabeza de espiga radial del axonema	gi 2905895	5	3
	Cadena intermedia de dineína	gi 72013805	35	19
	Fosfatasa PP1A	gi 72045279	5	4
	Melanotransferrina	gi 115744213	13	19
2	FDE5	gi 71067710	10	8
3	CK flagelar	gi 125302	11	10
4	Proteína similar a kinesina 2	gi 390331804	12	19
5	Proteína 147 con dominios "coiled-coil"	gi 390356835	7	6
6	Flotilina 1	gi 72141215	32	17
7	Proteasa 8 específica para sentrina	gi 72005346	2	1
8	Proteína activadora de GTPasa SLIT-ROB01	gi 115665310	2	2
9	Subunidad α de tubulina	gi 72065171	4	3
10	Actina	gi 115943916	26	17
	AK1	gi 126506320	28	20
	Flotilina 2	gi 390347106	27	18
	PKA RII	gi 47551027	4	3
11	Flotilina 1	gi 72141215	16	9
12	Receptor de Speract	gi 118063	8	5
13	VDAC-2	gi 72005582	5	3
14	Antígeno 6 asociado al espermatozoide	gi 72113568	2	2
15	Proteína GA10590-PA	gi 72032459	4	4
16	AK8	gi 390366422	50	27

Proteínas identificadas por MS/MS en 16 manchas detectadas en geles 2-D mediante experimentos de WB con el anticuerpo anti-PKAs. NPT: Número de péptidos totales; NPU: Número de péptidos únicos. Modificada de Loza-Huerta, 2013.

Figura 1. La ACm1 localizada en el área del acrosoma del eem disminuye con la reacción acrosomal. A) Inmunofluorescencia (microscopía confocal) de los espermatozoides marcados con anti-ACm1 (rojo) y con anti-faloidina (verde, que se une a actina; Su *et al.*, 2005) de espermatozoides control y de espermatozoides reaccionados. B). Los insertos en ambos casos (A y B) muestran la sobreposición del contraste de fases con la fluorescencia. Modificada de Romero, 2013.

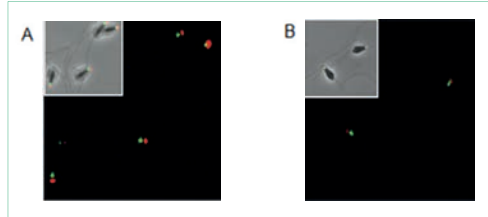


Figura 2. La rodamina-123 marca la mitocondria de los espermatozoides de *S. purpuratus*. Espermatozoides marcados con 10 μ M de Rodamina-123. A) Distribución de la fluorescencia observada en microscopio confocal. B) Sobreposición de la fluorescencia con las imágenes de contraste de fases observadas con un objetivo de 100x. Modificada de García-Rincón, 2016

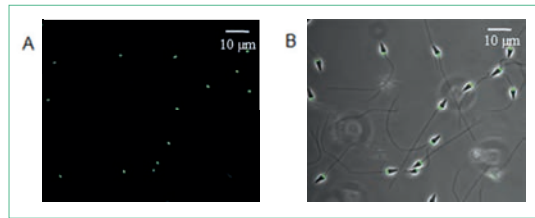
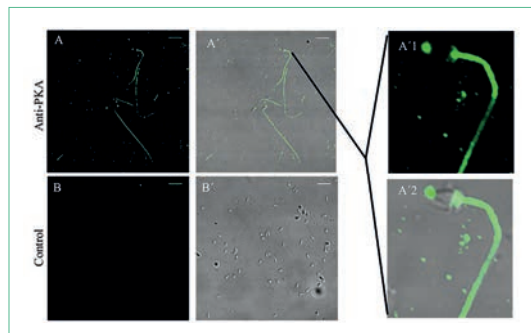


Figura 3. La PKA se distribuye a lo largo del espermatozoide e incluye las áreas de la mitocondria y del acrosoma. (A) Distribución de la fluorescencia de la PKA (anti-PKA; 1:100) en el eem. (A') sobreposición de la fluorescencia con luz blanca de los espermatozoides observados en microscopio confocal invertido Olympus FV1000 2P con un objetivo de 60x. (B y B') son los eem incubados solo con el anticuerpo secundario, (A'1) es la fluorescencia del espermatozoide indicado en (A') amplificado y (A'2) es la sobreposición de la fluorescencia con luz blanca del mismo espermatozoide. En todos los paneles la escala representa 10 μ m. Modificada de González-Mora, 2016.



Referencias

- Acin-Pérez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J.R. y Manfredi, G. (2010). NIH Public Access. *Cell*, 9(3), 265-276.
- Aggarwal-Howarth, S. y Scott, J.D. (2017). Pseudoscaffolds and anchoring proteins: the difference is in the details. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 371-379.
- Ahmad, F., Murata, T., Shimizu, K., Degerman, E., Maurice, D. y Manganiello, V. (2015). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Diseases*, 21(1), e25-e50. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275405/>
- Alves, A.P., Mulloy, B., Diniz, J.A. y Mourao, P.A. (1997). Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 6965-6971.
- Amano, R., Lee, J., Goto, N. y Harayama, H. (2007). Evidence for existence of cAMP-Epac signaling in the heads of mouse epididymal spermatozoa. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(1), 127-133.
- Amaral, A., Paiva, C., Attardo Parrinello, C., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Ramalho-Santos, J., et al. (2014). Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 5670-5684.
- Ardón, F., Rodríguez-Miranda, E., Beltrán, C., Hernández-Cruz, A. y Darszon, A. (2009). Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca^{2+} in sea urchin sperm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(1), 15-24.
- Banning, A., Tomasovic, A. y Tikkanen, R. (2011). Functional Aspects of Membrane Association of Reggie/Flotillin Proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 12(8), 725-735.
- Baxendale, R.W. y Fraser, L.R. (2003). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 66(2), 181-189.
- Beavo, J.A., Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research-still expanding after half a century. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 710-718.
- Beltrán, C., Zapata, O., Darszon, A., Beltran, C., Zapata, O. y Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry*, 35(23), 7591-7598.
- Beltrán, C., Galindo, B.E., Rodríguez-Miranda, E. y Sánchez, D. (2007). Transduction mechanism regulating ion fluxes in the sea urchin sperm in Signaling systems in the sea urchin. *Signal Transduction*, 7(2), 103-117.
- Beltrán, C., Vacquier, V.D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L.R. et al., (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(4), 1128-1135.
- Ben-Navi, R., Almog, T., Yao, Z., Seger, R. y Naor, Z. (2016). A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep37922.

- Bentley, J.K., Tubb, D.J. y Garbers, D.L. (1986). Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 14859-14862.
- Bezaire, V., Heigenhauser, G.J.F. y Spriet, L.L. (2004). Regulation of CPT I activity in intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria from human and rat skeletal muscle. *American journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 286(1), E85-E91.
- Bohmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., *et al.*, (2005). Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *The Embo Journal*, 24(15), 2741-2752.
- Bookbinder, L.H., Moy, G.W. y Vacquier, V.D. (1990). Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase. *The Journal of Cell Biology*, 111, 1859-1866.
- Bookbinder, L.H., Moy, G.W. y Vacquier, V.D. (1991). In vitro phosphorylation of sea urchin sperm adenylate cyclase by cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Molecular Reproduction and Development* 28(2), 150-157.
- Bracho, G.E., Fritch, J.J., Tash, J.S. (1998). Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 242(1), 231-237.
- Branham, M.T., Mayorga, L.S. y Tomes, C.N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8656-8666.
- Braun, T. y Dods, R.F. (1975). Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(3), 1097-1101.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J. y Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylate cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(1), 79-84.
- Capasso, A., Cardinale, V., De Petrocellis, B. y Parisi, E. (1990). Guanine Nucleotide Binding Proteins activate Adenylate Cyclase from Sea Urchin Sperm. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97(2), 339-342.
- Cardullo, R. A., Herrick, S.B., Peterson, M.J. y Dangott, L.J. (1994). Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Developmental Biology*, 162(2), 600-607.
- Carr, D., Fujita, A., Stentz, C., Liberty, G., Olson, G. y Narumiya, S. (2001). Identification of Sperm-specific Proteins that Interact with A-kinase Anchoring Proteins in a Manner Similar to the Type II Regulatory Subunit of PKA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17332-17338.
- Carr, D. y Newell, A. (2007). The role of A-kinase anchoring proteins (AKaps) in regulating sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl.*, 63, 135-141.
- Castellano, L.E., Martínez-Cadena, G., López-Godínez, J., Obregón, A. y García-Soto, J. (1997). Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in the sea urchin sperm. *European Journal of Cell Biology*, 74(4), 329-335.
- Catterall, W.A. (2016). HHS Public Access. *Curr Mol Pharmacol.*, 28(10), 1304-1314.
- Cerrillos Romero, M. (2013). La alteración de microdominios de membrana en espermatozoides de erizo de mar afecta sus funciones esenciales (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Colima, México.
- Chamberlain, L.H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Letters*, 559(1-3), 1-5.

- Chen, Y. (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*, 289(5479), 625-628.
- Christen, R., Schackmann, R.W. y Shapiro, B.M. (1982). Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Biological Chemistry*, 257(24), 14881-14890.
- Christen, R., Schackmann, R.W. y Shapiro, B.M. (1983). Metabolism of sea urchin sperm: Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *Journal Biological Chemistry*, 258(9), 5392-5399.
- Chung, J.J., Miki, K., Kim, D., Shim, S.H., Shi, H.F., Hwang, J.Y., *et al.* (2017). Catsper Z regulates the structural continuity of sperm Ca^{2+} signaling domains and is required for normal fertility. *eLife* 6, 1-18. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362262/>
- Cook, S.P. y Babcock, D.F. (1993). Selective modulation by cGMP of the K^{+} channel activated by speract. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22402-22407.
- Cooper, D.M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal*, 375(Pt 3), 517-529.
- Cooper, D.M.F. y Crossthwaite, A.J. (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 426-431.
- Cross, N.L. (2004). Reorganization of Lipid Rafts During Capacitation of Human Sperm1. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1367-1373.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B.E., Nishigaki, T. y Wood, C.D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 595-606.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltrán, C. y Treviño, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305-1355.
- Dart, C. (2010). Symposium Review: Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *The Journal of Physiology*, 588(17), 3169-3178.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., *et al.*, (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 396(6710), 474-477.
- Deng, N., Zhang, J., Zong, C., Wang, Y., Lu, H., Yang, P., *et al.*, (2011). Phosphoproteome Analysis Reveals Regulatory Sites in Major Pathways of Cardiac Mitochondria. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(2). doi: 10.1074/mcp.M110.000117.
- Eaton, S., Bartlett, K. y Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochemical Journal*, 320, 345-357.
- Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 32, 257-283.
- Espinal-Enríquez, J., Priego-Espinosa, D.A., Darszon, A., Beltrán, C. y Martínez-Mekler, G. (2017). Network model predicts that CatSper is the main Ca^{2+} channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Submitted to Scientific Reports*, 8-15.
- Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A., Robben, T.J., Strik, A.M., *et al.*, (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 2993-2998.
- Francis, S.H., Blount, M.A. y Corbin, J.D. (2011). Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases : Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiol Rev.*, 91, 651-690.

- Gaillard, A.R., Diener, D.R., Rosenbaum, J.L. y Sale, W.S. (2001). Flagellar radial spoke protein 3 is an A-kinase anchoring protein (AKAP). *Journal of Cell Biology*, 153(2), 443-448.
- Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, E.J. Jr., Darszon, A. y Darszon, A. (2000). Participation of a K(+) channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of stronglyotrotus purpuratus sea urchin sperm. *Developmental Biology*, 221(2), 285-294.
- Galindo, B.E., Neill, A.T., Vacquier, V.D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(1), 96-101.
- Garbers, D.L. (1981). The elevation of cyclic AMP concentrations in flagella-less sea urchin sperm heads. *Journal of Biological Chemistry*, 256(2), 620-624.
- Garbers, D.L. (1989). Cyclic GMP and the second messenger hypothesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1(2), 64-67.
- Garbers, D.L. y Kopf, G.S. (1980). The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 13, 251-306.
- Garbers, D.L., Tubb, D.J. y Kopf, G.S. (1980). Regulation of sea urchin sperm cyclic AMP-dependent protein kinases by an egg associated factor. *Biology of Reproduction*, 22(3), 526-532.
- García-Rincón, J. (2016). El speract, un péptido que regula la movilidad del espermatozoide de erizo de mar, altera su metabolismo energético mitocondrial. (Tesis de doctorado). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.
- García-Rincón, J., Darszon, A., Beltrán, C. (2016). Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1857(4), 415-426.
- Gauss, R., Seifert, R., Kaupp, UB. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685), 583-587.
- Gheber, L.A. y Edidin, M. (1999). A model for membrane patchiness: lateral diffusion in the presence of barriers and vesicle traffic. *Biophysical journal*, 77(6), 3163-3175.
- González-Mora, J. (2016). La Única Mitocondria del Espermatozoide de Erizo de Mar Contiene a la Adenilil Ciclasa Soluble. (Tesis de licenciatura) Cuernavaca (Morelos) México. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Granados-González, G., Mendoza-Lujambio, I., Rodríguez, E., Galindo, B.E., Beltrán, C. y Darszon, A. (2005). Identification of voltage-dependent Ca^{2+} channels in sea urchin sperm. *FEBS letters*, 579(29), 6667-6672.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C.D. y Darszon, A. (2010). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344(1), 52-65.
- Hanoune, J. y Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 145-174.
- Hansbrough, J.R. y Garbers, D.L. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 256(3), 1447-1452.
- Hansbrough, J.R., Kopf, G.S. y Garbers, D.L. (1980). The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *BBA-General Subjects*, 630(1), 82-91.

- Harumi, T., Hoshino, K. y Suzuki, N. (1992). Effects of sperm-activating peptide I on *Hemicentrotus pulcherrimus* spermatozoa in high potassium sea water. *Dev Growth Differ.*, 34(2), 163-172.
- Hinkley, R.E., Wright, B.D. y Greenberg, C.A. (1986). Induction of the acrosome reaction in sea urchin spermatozoa by the volatile anesthetic halothane. *Biology of Reproduction*, 34(1), 119-125.
- Hirohashi, N., Kamei, N., Kubo, H., Sawada, H., Matsumoto, M. y Hoshi, M. (2008). Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Development, growth & differentiation*, 50, S221-S238.
- Honegger, K., Capuano, P., Winter, C., Bacic, D., Stange, G., Wagner, C., *et al.*, (2004). Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). *PNAS USA*, 103(3), 803-808.
- Hussain, Y.H., Guasto, J.S., Zimmer, R.K., Stocker, R. y Riffell, J.A. (2016). Sperm chemotaxis promotes individual fertilization success in sea urchins. *The Journal of Experimental Biology*, 219(10), pp. 1458-1466
- Inaba, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological science* 20(9), 1043-1056
- Jaiswal, B.S. y Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(19), 10676-10681.
- Jezek, P., Engstová, J., Zäcková, V., Vercesi, A., Costa, A., Arruda, P., *et al.*, (1998). Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 319-327.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Malester, B., Rindler, M.J., Rehmann, H., Bos, J.L., *et al.*, (2006). cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic β cells and rat INS-1 cells. *The Journal of Physiology* 573(3), 595-609.
- Kaupp, U.B. y Álvarez, L. (2016). Sperm as microswimmers ??? navigation and sensing at the physical limit. *European Physical Journal: Special Topics* 225(11-12), 2119-2139.
- Kaupp, U. B. y Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol*, 63, 235-257.
- Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J.E., Helbig, A., Hagen, V., *et al.*, (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature Cell Biology* 5(2), 109-117.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., *et al.*, (1998). A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* 282(5397), 2275-2279.
- Kinukawa, M., Oda, S., Shirakura, Y., Okabe, M., Ohmuro, J., Baba, S.A., *et al.*, (2006). Roles of cAMP in regulating microtubule sliding and flagellar bending in demembranated hamster spermatozoa. *FEBS Letters* 580(5), 1515-1520.
- Kopf, G.S. y Garbers, D.L. (1980). Calcium and a fucose-sulfate-rich polymer regulate sperm cyclic nucleotide metabolism and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 22(5), 118-126
- Kopf, G., Tubb, D. y Garbers, D. (1979). Activation of sperm respiration by a low molecular weight egg factor and 8-bromoguanosine 3'5'-monophosphate. *J Boil. Chemistry*, 254(17), 8554-8560.

- Leclerc, P., De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*, 55(3), 684-692.
- Lee, H.C., Johnson, C. y Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology*, 95(1), 31-45.
- Lee, H.C. (1984). Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* 259(8), 4957-4963.
- Lee, H.C. (1985). The voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *Journal of Biological Chemistry*, 260(19), 10794-10799.
- Lee, H.C. y Garbers, D.L. (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), 16026-16032.
- Lee, M. e Iverson, R. (1976). An adenosine 3':5' monophosphate dependent protein kinase from sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 429, 123-136.
- Lewis, A. E., Aesoy, R., Bakke, M. (2016). Role of EPAC in cAMP-Mediated Actions in Adrenocortical Cells. *Frontiers in Endocrinology* 7, 1-7.
- Liguori, L., Rambotti, M.G., Bellezza, I. y Minelli, A. (2004). Electron microscopic cytochemistry of adenylyl cyclase activity in mouse spermatozoa. *J Histochem Cytochem*, 52(6), 833-836.
- Lillie, F.R. (1912). The production of sperm iso-agglutinins by ova. *Science* XXVI (929), 529-530.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, Z. y Sargiacomo, M. (2004). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology* 4(7), 231-235.
- Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J. y Levin, L.R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase: Synergism between calcium and bicarbonate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15922-15926.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M.A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., *et al.*, (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol Endocrinol* 19(5), 1277-1290.
- Loza-Huerta, A. (2007). *Identificación del tipo de adenilil ciclasas que participan en la regulación de la movilidad del espermatozoide de erizo de mar* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Colima.
- Loza-Huerta, A. (2013). *Participación de complejos de señalización que regulan la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar mediante fosforilación dependiente de AMPc* (Tesis de doctorado). Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Loza-Huerta, A., Vera-Estrella, R., Darszon, A. y Beltrán, C. (2013). Certain Strongylocentrotus purpuratus sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(11), 5305-5315.
- Martens, J.R., Navarro-Polanco, R., Coppock, E.A., Nishiyama, A., Parshley, L., Grobaski, T. D., *et al.*, (2000). Differential targeting of shaker-like potassium channels to lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry* 275(11), 7443-7446.

- Mata-Martínez, E. (2010). Identificación de proteínas de la cascada de señalización del speract en balsas lipídicas del espermatozoide de erizo de mar (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
- Matsumoto, M., Solzin, J., Helbig, A., Hagen, V., Ueno, S., Kawase, O., *et al.* (2003). A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Developmental Biology*, 260(2), 314-324.
- Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J. y Manganiello, V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(4), 290-314.
- Miller, R. L. (1985). Sperm Chemo-Orientation in the Metazoa. En C. B. Metz y A. Monroy (Eds.), *Biology of Fertilization* (pp. 275-337). New York: Academic Press.
- Miranda, P.V., Allaire, A., Sosnik, J. y Visconti, P.E. (2009). Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of Reproduction* 80(5), 897-904.
- Miro-Moran, A., Jardín, I., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G.M., Peña, F.J., Tapia, J.A., *et al.* (2012). Identification and function of exchange proteins activated directly by cyclic AMP (Epac) in mammalian spermatozoa. *PLoS ONE* 7(5), 1-11.
- Mita, M., Harumi, T., Suzuki, N. y Ueta, N. (1991). Localization and characterization of phosphatidylcholine in sea urchin spermatozoa. *The Journal of Biochemistry*, 242, 238-242.
- Mita, M. y Ueta, N. (1990). Phosphatidylcholine metabolism for energy production in sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1047(2), 175-179.
- Mizrahi, R. y Breitbart, H. (2014). Mitochondrial PKA mediates sperm motility. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1840(12), 3404-3412.
- Monterisi, S. y Zaccolo, M. (2017). Components of the mitochondrial cAMP signalosome. *Biochemical Society Transactions* 45(1), 269-274.
- Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., *et al.*, (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research* 97(12), 1296-1304.
- Mourelle, M., Vargas, I. y Darszon, A. (1984). Adenylate Cyclase Activity of Membrane Fractions Isolated From Sea Urchin Sperm. *Gamete Research*, 97, 87-97.
- Moy, G.W., Mendoza, L.M., Schulz, J.R., Swanson, W.J., Glabe, C.G. y Vacquier, V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *Journal of Cell Biology*, 133(4), 809-817.
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*, 115(4), 377-388.
- Murofushi, H., Ishiguro, K., Takahashi, D., Ikeda, J. y Sakai, H. (1986). Regulation of sperm flagellar movement by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 6(2), 83-88.
- Nebenfuhr, A. (2002). Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiology* 130(3), 1102-1108.
- Neill, A.T., Moy, G.W. y Vacquier, V.D. (2004). Polycystin-2 associates with the polycystin-1 homolog, suREJ3, and localizes to the acrosomal region of sea urchin spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 67(4), 472-477.

- Neill, A.T. y Vacquier, V.D. (2004). Ligands and receptors mediating signal transduction in sea urchin spermatozoa. *Reproduction* 127(2), 141-149.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L. y Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149-1158.
- Nomura, M., Beltrán, C., Darszon, A. y Vacquier, V.D. (2005). A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene*, 353(2), 231-238.
- Nomura, M. y Vacquier, V.D. (2006). Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63, 582-590.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Lennarz, W.J. y Kitajima, K. (1999). Isolation and Characterization of Low Density Detergent-Insoluble Membrane (LD-DIM) Fraction from Sea Urchin Sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3), 616-623.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacquier, V. D., Lennarz, W. J., *et al.*, (2000). Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm. *Glycoconjugate journal*, 17(3-4), 205-214.
- Pagliarini, D.J. y Dixon, J.E. (2006). Mitochondrial modulation: Reversible phosphorylation takes center stage? *Trends in Biochemical Sciences*, 31(1), 26-34.
- Patel, H.H., Murray, F. e Insel, P.A. (2008). Caveolae as Organizers of Pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), 359-391.
- Paupard, M., MacLeod, J., Wasco, W. y Orr, G. (1988). Major 56,000-dalton, soluble phosphoprotein present in bovine sperm is the regulatory subunit of a type II cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Cellular Biochemistry*, 37, 161-175.
- Pike, L.J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*, 378, 281-292.
- Ramarao, C.S. y Garbers, D.L. (1985). Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 260(14), 8390-8396.
- Ren, D., Navarro, B., Pérez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., *et al.* (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603-609.
- Ruete, M.C., Lucchesi, O., Bustos, M.A. y Tomes, CN. (2014). Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm's acrosome during exocytosis. *Cell Communication and Signaling* 12(1): 43 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156617/pdf/12964_2014_Article_43.pdf
- Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. y Beavo, J.A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93(4), 280-291.
- Sánchez, D., Labarca, P. y Darszon, A. (2001). Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP. *FEBS Lett* 503(1), 111-115.
- Sano, M. (1976). Subcellular localizations of guanylate cyclase and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in sea urchin sperm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 428(2), 525-531.
- Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., *et al.* (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93(5), 717-729.
- Schmidt, M., Dekker, F.J. y Maarsingh, H. (2013). Exchange Protein Directly Activated by cAMP (epac): A Multidomain cAMP Mediator in the Regulation of Diverse Biological Functions. *Pharmacological Reviews* 65(2), 670-709.

- Schuh, S.M., Carlson, A.E., McKnight, G.S., Conti, M., Hille, B. y Babcock, D.F. (2006). Signaling Pathways for Modulation of Mouse Sperm Motility by Adenosine and Catecholamine Agonists. *Biology of Reproduction*, 74(3), 492-500.
- Scott, J.D. y McCartney, S. (1994). Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Molecular Endocrinology* 8(August), 5-11.
- SeGall, G. K. y Lennarz, W.J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Developmental Biology*, 71(1), 33-48.
- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Álvarez, L., Trötschel, C., Poetsch, A., *et al.* (2015). The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *The Embo Journal*, 34(3), 379-392.
- Shapiro, B., Schackmann, R., Tombes, R. y Kazazoglou, T. (1985). Coupled ionic and enzymatic regulation of sperm behavior. En R. Levine y A. Ginsburg (eds.), *Current topics in cellular regulation* (pp. 97-113). Florida: Academic Press.
- Shiba, K. e Inaba, K. (2014). Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in Ciona sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13192-13208.
- Simons, K. y Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell Biology*, 1(1), 31-39.
- Sleight, S.B., Miranda, P.V., Plaskett, N-W., Maier, B., Lysiak, J., Scrable, H., *et al.*, (2005). Isolation and Proteomic Analysis of Mouse Sperm Detergent-Resistant Membrane Fractions: Evidence for Dissociation of Lipid Rafts During Capacitation. *Biology of Reproduction* 73(4), 721-729.
- Smith, E. y Yang, P. (2004). The Radial Spokes and Central apparatus: Mechano-Chemical Transducers That Regulate Flagellar Motility. *Cell Motil Cytoskeleton*, 57(1): 8-17
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J.A., Wetzel, C.H., Zimmer, R.K., *et al.*, (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*, 299(5615), 2054-2058.
- Su, Y.H., Chen, S.H., Zhou, H. y Vacquier, V.D. (2005). Tandem mass spectrometry identifies proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase when sea urchin sperm undergo the acrosome reaction. *Developmental Biology*, 285(1), 116-125.
- Su, Y.H. y Vacquier, V.D. (2006). Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell.*, 17(1), 114-121.
- Suzuki, N. (1995). Structure, Function and Biosynthesis of Sperm-Activating Peptides and Fucose Sulfate Glycoconjugate in the Extracellular Coat of sea Urchin Eggs. *Zoological Science* 12(1),13-27.
- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H. e Isaka, S. (1981). Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99(4), 1238-1244.
- Suzuki, N. y Garbers, D.L. (1984). Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biology of reproduction* 30(5), 1167-1174.
- Suzuki, N., Shimomura, H., Radany, E.W., Ramarao, C.S., Ward, G.E., Bentley, J.K., *et al.*, (1984). A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 259(23), 14874-14879.
- Tash, J.S. (1989). Protein phosphorylation: The second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 14(3), 332-339.

- Tash, J.S. y Means, A.R. (1983). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biology of reproduction*, 28(1), 75-104.
- Tash, J.S., Hidaka, H. y Means, A.R. (1986). Axokinin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility. *Journal of Cell Biology*, 103(2), 649-655.
- Tash, J.S., Means, A.R. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biology of Reproduction* 26(4), 745-763.
- Taussig, R. y Gilman, A.G. (1995). Mammalian Membrane Bound Adenylyl Cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1),1-4.
- Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E. y Anand, G. (2004). PKA: A portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1697(1-2), 259-269.
- Tilney, L.G., Kiehart, D.P., Sardet, C. y Tilney, M. (1978). Polymerization of actin. IV. Role of Ca^{++} and H^{+} in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 77(2), 536-550.
- Toowicharanont, P. y Shapiro, B.M. (1988). Regional differentiation of the sea urchin sperm plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6877-6883.
- Travis, A.J., Merdushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W., et al. (2001). Expression and Localization of Caveolin-1, and the Presence of Membrane Rafts, in Mouse and Guinea Pig Spermatozoa. *Developmental Biology* 240(2), 599-610.
- Treviño, C.L., Serrano, C.J., Beltrán, C., Felix, R. y Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Letters* 509(1), 119-125
- Ueno, H., Shibasaki, T., Iwanaga, T., Takahashi, K., Yokoyama, Y., Liu, L.-M., et al., (2001). Characterization of the Gene EPAC2: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Expression, and Identification of the Liver-Specific Isoform. *Genomics* 78(1), 91-98.
- Urióstegui C., Martínez-Cadena, G., López-Godínez, J., Castellano, L.E., Nishisaki, T., Darszon, A., et al., (2007). Rho-kinase (ROCK) in sea urchin sperm: Its role in regulating the intracellular pH during the acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364(3), 470-475.
- Vacquier, V.D. y Moy, G.W. (1997). The fucose sulfate polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Developmental Biology*, 192(1), 125-135.
- Vacquier, V.D., Loza-Huerta, A., García-Rincón, J., Darszon, A. y Beltrán, C. (2014). Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842(12), 2621-2628.
- Valsecchi, F., Konrad, C. y Manfredi, G. (2014). Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2555-2560.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., et al., (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121(4), 1139-1150.
- Vizel, R., Hillman, P., Ickowicz, D. y Breitbart, H. (2015). AKAP3 degradation in sperm capacitation is regulated by its tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1850(9), 1912-1920.

- Walsh, D., Perkins, J. y Krebs, E. (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), 3763-3766.
- Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K. y Garbers, D.L. (2003). A new sperm-specific Na^+/H^+ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1117-1122.
- Ward, G.E., Garbers, D.L. y Vacquier, V.D. (1985). Effects of extracellular egg factors on sperm guanylate cyclase. *Science*, 227(4688), 768-770.
- Watkins, H.D., Kopf, G.S. y Garbers, D.L. (1978). Activation of sperm adenylate cyclase by factors associated with eggs. *Biology of Reproduction*, 19(4), 890-894.
- Wertheimer, E., Krapf, D., De La Vega-Beltran, J.L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., et al., (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35307-35320.
- White, D., De Lamirande, E. y Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 210(22), 4053-4064.
- Wothe, D.D., Charbonneau, H. y Shapiro, B.M. (1990). The phosphocreatine shuttle of sea urchin sperm: flagellar creatine kinase resulted from a gene triplication. *PNAS USA*, 87(13), 5203-5207.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371-372.
- Yanagimachi, R. (1994a). Mammalian Fertilization. En E. Knobil y J. D. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 189-317), second edition. New York: Raven Press.
- Yoshida, M. y Yoshida, K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca^{2+} . *Molecular Human Reproduction*, 17(8), 457-465.
- Yoshimura, A., Nakano, I. y Shingyoji, C. (2007). Inhibition by ATP and activation by ADP in the regulation of flagellar movement in sea urchin sperm. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 64(10), 777-793.
- Zhang, C-L., Katoh, M., Shibasaki, T., Minami, K., Sunaga, Y., Takahashi, H., et al., (2009). The cAMP Sensor Epac2 Is a Direct Target of Antidiabetic Sulfonylurea Drugs. *Science*, 325(July), 607-610.
- Zheng, Y.Z., Berg, K.B. y Foster, L.J. (2008). Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins. *The Journal of Lipid Research*, 50(5), 988-998.
- Zhu, L. e Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca^{2+} signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular Reproduction and Development*, 78(12), 920-929.
- Zigler, K.S., McCartney, M.A., Levitan, D.R. y Lessios, H. A. (2005). Sea urchin bindin divergence predicts gamete compatibility. *Evolution*, 59(11), 2399-2404.
- Zimmermann, B., Chiorini, J.A., Ma, Y., Kotin, R.M. y Herberg, F. W. (1999). PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit Type I. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5370-5378.
- Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., et al. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *Faseb Journal*, 17(1), 82-84.

Zittronski, N., Borth, H., Ackermann, F., Meyer, D., Vieweg, L., Breit, A., *et al.*, (2010). The “acrosomal synapse”: Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa. *Communicative and Integrative Biology*, 3(6), 513-521.

Zufall, F., Shepherd, G.M. y Barnstable, C.J. (1997). Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 404-412.

.....

Glosario

- AC: adenil ciclase.
- ACm: adenil ciclase de membrana.
- AKAP: proteína de andamiaje de cinasa A.
- AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.
- ATP: adenosina trifosfato.
- BL: balsa lipídica.
- [Ca⁺²]_i: concentración de calcio intracelular
- CaM: calmodulina.
- DDA: 2',5'-Dideoxiadenosina.
- EJ: gelatina del óvulo.
- Em: potencial de membrana.
- Epac: proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPc.
- FDE: fosfodiesterasa.
- Gs: proteína G estimuladora.
- GC: guanil ciclase.
- GCm: GC de membrana.
- GMPc: guanosina monofosfato cíclico.
- kDa: kilodaltones.
- KH7: ácido propanoico 2-(1Hbenzimidazol-2-iltio)-2-[(5-bromo-2-hidroxifenil) metileno] hidracida.
- MS/MS: espectrometría de masas en tándem.
- mV: milivolts.
- NHE: intercambiador Na⁺/H⁺.
- sNHE: NHE específico del espermatozoide.
- PFS: polímero de fucosa sulfatada.
- pH_i: potencial de hidrógeno intracelular.
- PKA: proteína cinasa dependiente de AMPc.
- PKC: proteína cinasa C estimulada por diacilglicerol.
- PM: peso molecular.
- RA: reacción acrosomal.
- RSP: AKAP, llamada así por sus siglas en inglés para Radial spoke protein.
- Sx: serina, donde x = número de aminoácido.
- sAC: adenilil ciclase soluble.
- SAP: péptido activador de los espermatozoides.
- Sp: Strongylocentrotus purpuratus.
- SpHCN: canal iónico regulado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos de Sp.
- SUsAC: sAC de erizo de mar.
- Tx, treonina, donde x = número de aminoácido.
- WB: Western Blot.

CASPASAS EN ESPERMATOZOIDE

Blanca Patricia López Trinidad,^{1*}
Mina Konigsberg Fainstein,
Alejandro Ávalos Rodríguez y
Edith Arenas Ríos

^{1*} Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco no. 186,
col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México. Correo electrónico: blanca.trinidad22@gmail.com

1. Introducción

Las caspasas son proteínas que cortan a otras proteínas en residuos de ácido aspártico y que ejecutan un tipo de muerte celular llamado apoptosis. Éste es un proceso que se lleva a cabo de manera ordenada sin desencadenar una respuesta inflamatoria. En espermatozoides esta clase de muerte no está definida, pero la presencia de estas proteínas en dicha célula se ha vinculado a diversas alteraciones que puede sufrir el espermatozoide, como la congelación, o a patologías humanas.

2. ¿Qué es la apoptosis?

La apoptosis es un tipo de muerte celular en donde se eliminan células individuales. Sucede de manera ordenada y regulada, por lo que muchas veces se le define como “muerte celular programada” (preparación de la maquinaria necesaria para ejecutar una actividad en el momento deseado), aunque no es la única muerte celular programada (Galluzzi *et al.*, 2015; Kroemer *et al.*, 2009; Parrish, Freel y Kornbluth, 2013). En las células somáticas, la apoptosis presenta una serie de cambios morfológicos, como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, la condensación y fragmentación de cromatina, así como el empaquetamiento de los fragmentos celulares en vesículas formadas de membrana plasmática (cuerpos apoptóticos) (Earnshaw *et al.*, 1999; McIlwain *et al.*, 2013). Además de los cambios morfológicos, se

pueden reconocer modificaciones bioquímicas, como las que suceden en la superficie de la membrana que inducen la externalización de la fosfatidilserina (PS) (Elmore, 2007); el rompimiento del ADN en fragmentos regulares, normalmente múltiplos de aproximadamente 200 bp (Elmore, 2007), así como la escisión de subconjuntos de polipéptidos y proteínas (Earnshaw *et al.*, 1999).

El corte de las proteínas se lleva a cabo por una familia de proteasas llamadas caspasas (Earnshaw *et al.*, 1999). La muerte celular por esta vía puede ocurrir en respuesta a varios tipos de estrés celular, daño al ADN, privación de factores de crecimiento, estrés de retículo endoplásmico y señales del medio ambiente, entre otras. También la pueden activar otras causas, como la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia y radicales libres (que provocan estrés dentro de la célula) (Green y Llambi, 2015).

3. ¿Qué son las caspasas?

Las caspasas son proteínas que cortan después de residuos de ácido aspártico (Cade y Clark, 2015; Grunewald *et al.*, 2009) y este corte depende de un residuo de cisteína presente en su sitio catalítico (McIlwain *et al.*, 2013). Son proteínas que se generan como proenzimas o zimógenos (proteína a partir de la cual se creará una enzima activa) y se llaman procaspasas al momento en que están inactivas. Para activarlas es necesario que ocurra una serie de cambios que les permiten madurar y cumplir su función. La estructura de las procaspasas contiene un prodominio (sección de una proteína que contribuye a su conformación tridimensional) N- terminal, seguido por una subunidad larga y una corta (fig. 1). En algunas procaspasas esta subunidad está separada por un pequeño espacio que es eliminado del zimógeno durante la maduración de la enzima.

Todas las escisiones involucradas en la maduración de las procaspasas se llevan a cabo en los carboxilos de los residuos de aspartato. Otra estructura que se puede identificar en estas proteínas son los prodominios, dentro de los cuales es posible reconocer dos motivos (secuencia de aminoácidos altamente

conservada): el dominio efector de muerte (DED, por sus siglas en inglés, death effector domain) y que aparentemente está involucrado en la interacción con otras proteínas que señalizan muerte, como son MORT1/FADD y TRADD; y el dominio reclutador de caspasas (CARD, caspase recruitment domain), que es importante para la interacción de las caspasas maduras con otras enzimas, además de su relación con proteínas adaptadoras y reguladoras (Earnshaw *et al.*, 1999).

Las caspasas con prodominios cortos de alrededor de 23 aminoácidos (por ejemplo, las 6 y 7), al parecer, están involucradas en la iniciación de la respuesta apoptótica, por lo que se les denomina iniciadoras. Las caspasas con prodominios de alrededor de 219 aminoácidos (por ejemplo, la caspasa 10) son llamadas efectoras, las cuales deben ser activadas por las iniciadoras (fig. 1) (Earnshaw *et al.*, 1999).

Para que una procaspasa se active es necesario que pase por una serie de procesos que le ayudarán a madurar; el primer paso es su dimerización con otra procaspasa, ya que este tipo de enzimas se activan a través de “proximidad inducida”, es decir, cuando la proteína llamada adaptador interactúa con el prodominio de otra proteína de la misma identidad (fig. 1). Esto resulta en la formación de un tetrámero compuesto por dos unidades iguales que se unen en pares. El proceso continúa con al menos dos escisiones más que separan la subunidad larga de la subunidad pequeña. Los nuevos extremos se pliegan sobre los dímeros, promoviendo cambios conformacionales para crear dos sitios activos en la que ahora será la caspasa madura, seguido de la remoción de los prodominios. Sin embargo, se ha sugerido que esta eliminación no siempre es necesaria (fig. 1) (Cade y Clark, 2015; Earnshaw *et al.*, 1999; Green y Llambi, 2015).

3.1 Tipos de caspasas

Como se mencionó anteriormente, las caspasas se pueden clasificar según los dominios que contienen: las iniciadoras tienen un prodominio,

un dominio largo y uno corto, mientras que las efectoras sólo tienen el dominio largo y el corto. Otra manera de clasificarlas es de acuerdo con su función, como caspasas inflamatorias y apoptóticas, estas últimas a su vez pueden ser divididas según su estructura y función como iniciadoras o efectoras (fig. 2).

Las caspasas apoptóticas iniciadoras (CAI) son monómeros estables y se activan por dimerización (fig. 1), tras la cual adquieren la capacidad de autoprocesamiento, por lo que pueden escindir la unión entre el prodominio y la unión entre la subunidad larga y la corta. Este mismo procedimiento lo llevan a cabo las efectoras (con la diferencia de que no poseen un prodominio). Aun después de su dimerización, las caspasas apoptóticas efectoras (CAE) todavía no se encuentran activas y es necesario que sean escindidas por las CAI para que se activen. Al igual que las caspasas apoptóticas, las inflamatorias se activan por dimerización (fig. 2) (Cade y Clark, 2015).

4. Vías de activación de las caspasas

La caspasa 8 es la caspasa iniciadora más estudiada de la vía de apoptosis extrínseca, es decir, la que se activa mediante señales de muerte que vienen del exterior. Una de las vías extrínsecas importantes se relaciona con la activación de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), que posee un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio citoplasmático de alrededor de 80 aminoácidos, llamado “dominio de muerte” (DD) (Elmore, 2007). Este receptor recibe a un ligando de muerte (por ejemplo, FasL o TNF-alfa), induciendo su oligomerización y favoreciendo el reclutamiento del complejo de señalización de inducción de muerte (DISC). DISC está formado por proteínas que contienen e interactúan a través del DD (fig. 3), como por ejemplo FADD (dominio de muerte asociado a FAS) o TRADD (dominio de muerte asociado al receptor de TNF).

FADD o TRADD, a su vez, exponen su dominio DED (dominio efector de muerte) que le ayuda a interactuar con la caspasa 8, que también contiene un

dominio DED, lo que provoca que los monómeros de la caspasa 8 entren en proximidad y se dimericen, lo cual incita que se active y ocurran las escisiones necesarias para que la enzima madure totalmente (fig. 1). A partir de este paso la ruta puede tener varias alternativas: que la caspasa 8 active a las caspasas efectoras 3 y 7 o que escinda o corte a Bid (proteína proapoptótica que pertenece a la familia BH3), que desencadenará la muerte por la vía mitocondrial (Nair *et al.*, 2014) (fig. 3A).

La caspasa más estudiada en la muerte celular por la vía intrínseca es la caspasa 9, ya que formará parte del apoptosoma. Lo anterior es regulado por factores externos e internos, provocando alteraciones en la membrana mitocondrial, como la formación de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), lo que provoca la pérdida del potencial de membrana y la liberación de dos grupos principales de proteínas proapoptóticas que normalmente están secuestradas en la mitocondria y que escapan hacia el citosol (Elmore, 2007). El primer grupo de proteínas proapoptóticas está formado por el citocromo c, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, que activan la vía mitocondrial dependiente de caspasa. El citocromo c se une a Apaf 1 y a la procaspasa 9 para formar el “apoptosoma”, que es un heptámero de 7 subunidades de cada una de las proteínas antes mencionadas. Esta unión favorecerá la activación de la procaspasa 9, convirtiéndose en la caspasa 9 activa (fig. 3B). Por otro lado, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi inducen la apoptosis, inhibiendo a las proteínas que impiden la apoptosis (IAP) (Elmore, 2007; Green y Llambi, 2015; Kuhlbrandt, 2015; Schultz y Harrington, 2003).

La caspasa 1 es la más importante en los procesos inflamatorios, asociada principalmente a la piroptosis, un tipo de muerte celular inflamatoria, acompañado de la liberación del contenido citosólico, coincidiendo con la apoptosis en la desintegración del ADN, pero en este fenómeno se visualiza la ruptura en forma de escalera. Durante el proceso, la caspasa que cumple la función iniciadora y efectora es la caspasa 1 (Lin y Zhang, 2017), misma que está involucrada en el procesamiento de

citosinas (pequeñas proteínas secretadas principalmente por las células T ayudadoras por los monocitos; Zhang y An, 2007), las cuales tienen un efecto específico en la interacción y comunicación entre células. Particularmente, la caspasa 1 puede activar al precursor de la interleucina 1 B (pro-IL-1B, citosina implicada en procesos inflamatorios).

La descripción anterior ayudará a entender el funcionamiento de las caspasas que hasta el momento se han encontrado en espermatozoides.

5. Caspasas en espermatozoides

De manera general, la presencia de caspasas (1, 3, 9, 8) en espermatozoides eyaculados siempre se ha asociado a una mala calidad espermática, lo cual también se puede relacionar con la muerte celular. A continuación discutiremos los reportes donde existe presencia de caspasas y bajo qué condiciones se presentan.

5.1 Caspasas asociadas con la infertilidad masculina

En diversos estudios se ha abordado la relación que tiene la presencia de las caspasas activas con la baja movilidad de los espermatozoides. Los primeros análisis los realizaron Weng y colaboradores en el 2002, en los que separaron los espermatozoides de pacientes infértiles, así como de donadores sanos, utilizando concentraciones discontinuas de percoll (45% y 90%), marcando a los espermatozoides con anticuerpos fluorescentes para caspasas activas; se encontró una mayor cantidad de caspasa 3 activa en la porción de baja movilidad (45% de percoll), exclusivamente en la pieza media de los espermatozoides tanto de los donadores sanos como de los pacientes infértiles, por lo que propusieron que la apoptosis dependiente de caspasas puede ser desencadenada en la región donde se encuentran las mitocondrias y la gota citoplásmica de espermatozoides anormales e inmaduros.

Conjuntamente, determinaron la actividad general de las caspasas y encontraron que en pacientes infértiles es mayor, aun en la fracción de alta movilidad. Debido a que el espermatozoide tiene escaso citoplasma, los autores plantean que la actividad de la caspasa 3 en hombres sanos es más eficiente, por lo que requiere niveles bajos. Además de que en la fracción de alta movilidad muestran una correlación negativa entre la movilidad y la actividad de las caspasas. En este mismo estudio cuantificaron la fragmentación del ADN y observaron una correlación positiva entre dicha fragmentación y la presencia de caspasa 3 en los espermatozoides (Weng *et al.*, 2002).

No obstante, no fueron los únicos que detectaron caspasas relacionadas con problemas en los parámetros espermáticos, ya que Paasch y colaboradores, en el 2003, encontraron caspasas en espermatozoides, separando previamente la muestra entre los que presentaban exposición de PS y aquellos que no la presentaban. En general, los donadores mostraban bajos niveles de caspasas en comparación con los pacientes infértiles. Sin embargo, los espermatozoides que presentaba externalización de PS registraban altos niveles de caspasas tanto en donadores sanos, como en pacientes con infertilidad (Paasch *et al.*, 2003). Esto coincide con investigaciones en las que discuten que las modificaciones de la funcionalidad de la membrana también pueden estar ligadas con la actividad de la caspasa 3, la cual escinde proteínas cinasas, modificando así la migración bidireccional de los fosfolípidos a través de la bicapa lipídica, por la retención de la actividad de la escramblasa (Frasch *et al.*, 2000). Paasch y colaboradores también argumentan que es un elemento residual de la espermatogénesis y son propensas a activarse debido al daño en la membrana. Además de que la presencia de caspasas indican un defecto o remodelación incompleta del citoplasma durante la espermatogénesis, ya que encontraron marcaje de caspasas (1 y 9) en la pieza media, específicamente en el citoplasma residual de pacientes, mientras que en los donadores se localizaba en la región posacrosomal.

Otros estudios se han enfocado en determinar la relación de las caspasas, así como la liberación del citocromo c, detectando un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y la concentración de citocromo c en el plasma seminal, además de encontrar marcaje de caspasa 3 en la pieza media, por lo que sugieren que hay una posible relación entre el incremento del daño indicado por el estrés oxidante y la apoptosis mediada por CP en pacientes con un factor de infertilidad masculina.

5.2 Activación de caspasas por congelación

Una de las técnicas en las que se apoya la reproducción animal asistida es la congelación de gametos, la cual consiste en someter las células a bajas temperaturas para disminuir su metabolismo y de este modo preservarlas; sin embargo, es imprescindible que se usen compuestos que deshidraten a las células para evitar la formación de cristales dentro y fuera de ella, a los que llaman crioprotectores.

Entre los crioprotectores más comunes está el glicerol. Grunewald probó dos concentraciones diferentes de glicerol (7% y 14%) y observó el efecto que tenía sobre la activación de las caspasas durante el proceso de congelación. Encontró que éste provoca el aumento de todas las caspasas medidas en el estudio (1, 3, 8 y 9), tanto en donadores sanos, como en pacientes infértiles. Dentro de las peculiaridades que reportan es que tanto la caspasa 8 como la 9 aumentan a altas concentraciones de glicerol y de manera significativa también lo hacen en las muestras que provenían de pacientes infértiles. Mientras que los precursores de la caspasa 3 (32kDa) disminuyen cuando se incrementan las concentraciones de antioxidantes como el glutatión (Grunewald *et al.*, 2005).

En 2004, Paasch ya había reportado la activación de las caspasas durante la congelación, mencionando que conduce a la activación de las caspasas 1, 8, 9 y 3, y que además se relaciona con la externalización de fosfatidilserina. Para corroborar este último punto se separaron las células

positivas y negativas a fosfatidilserina, encontrando un aumento de todas las caspasas en la porción de espermatozoides que presentaron exposición de fosfatidilserina (Paasch *et al.*, 2004).

La criopreservación y los crioprotectores pueden desencadenar la muerte celular programada, asociada a la integridad de la membrana y la activación de caspasas; esto puede deberse a que la criopreservación de los espermatozoides conduce a varias alteraciones estructurales y funcionales de la membrana plasmática, que pueden llevar a la pérdida de la estabilidad de la bicapa lipídica y a un criodaño subletal de espermatozoides. Esta falta de integridad de la membrana puede iniciar la cascada de las caspasas. Los crioprotectores, como ejemplo el glicerol, por sí mismo tiene la capacidad de contribuir a la activación de las caspasas vía los efectos tóxicos sobre la mitocondria, ya que el estrés citotóxico conlleva perturbaciones mitocondriales, seguido de fragmentación del ADN (Grunewald *et al.*, 2005).

5.3 Activación de caspasas por peróxido y progesterona

Se ha demostrado, en repetidas ocasiones, que el calcio juega un papel importante en la señalización de la muerte en células somáticas y, por lo tanto, en la activación de las caspasas. La progesterona puede ser un poderoso movilizador de calcio en los espermatozoides (Demaurex y Distelhorst, 2003), permitiendo la salida de los sitios de almacenamiento o generando una serie de reacciones que permiten la entrada de este ion. Existen diversos componentes intracelulares sensibles a concentraciones de calcio, como la mitocondria, por lo que una elevación de la concentración puede inducir apoptosis, ya que puede promover la liberación de factores (como el citocromo c) que además perjudican la función mitocondrial.

En espermatozoides se ha probado el efecto de la progesterona sobre la activación de las caspasas en ellos, encontrando que a partir de una

exposición de 15 y hasta 120 minutos con 20 μM de progesterona hay un aumento en la cantidad de caspasa 3 activa, así como de la caspasa 9; este efecto se acentuó cuando los espermatozoides fueron sometidos por 60 minutos con 10 μl de progesterona. Estos efectos se ven disminuidos cuando los espermatozoides son tratados con DEVD-CMK o z-LEHD-FMK (inhibidores de caspasa 3 y 9) (Bejarano *et al.*, 2008). En otros estudios también se ha reportado un incremento de la caspasa 3 activa usando la misma concentración de progesterona (Bejarano *et al.*, 2008). La importancia de lo anterior radica en que en células somáticas el calcio tiene una función importante en la señalización de muerte; sin embargo, en espermatozoides se le puede dar un papel dual a este componente, ya que la progesterona es una hormona esteroidea que induce la entrada de calcio en el espermatozoide y provoca múltiples respuestas fisiológicas esenciales para que se lleve a cabo la fertilización (Lishko *et al.*, 2011), además de que puede efectuar procesos como la muerte de la misma célula.

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una ERO que, además de poder movilizar calcio, hace modificaciones a otras proteínas, provocando la activación de caspasas y eventualmente la muerte (Bejarano *et al.*, 2008). En espermatozoides, usando 10 μM de H_2O_2 durante 60 minutos, se obtiene la mayor activación de caspasa 3 (Bejarano *et al.*, 2008; Demaurex y Distelhorst, 2003) e irónicamente, concentraciones altas de H_2O_2 no producen un cambio significativo en la activación de las caspasas (Bejarano *et al.*, 2008). Es importante considerar que si bien las ERO tienen la capacidad de causar daño en el espermatozoide, también pueden participar en procesos importantes en la fisiología espermática, activando o inactivando proteínas para que se cumplan procesos como la activación de la movilidad, a través del incremento del adenosil monofosfato cíclico (AMPC) y la fosforilación de proteínas, para la adquisición de su capacidad fertilizante. Así, entre los efectos negativos y positivos de las ERO a los espermatozoides, parece que el buen funcionamiento dependerá de su adecuada regulación por los antioxidantes (Arenas-Ríos *et al.*, 2014).

5.4 Otras asociaciones

La activación de las caspasas en los espermatozoides también se ha relacionado con las personas fumadoras, ya que se ha demostrado el impacto del humo de cigarro en la infertilidad masculina (Soares y Melo, 2008). En 2011 (El-Melegy y Ali, 2011) se realizó un estudio que analizó el porcentaje de caspasa 3 activa en espermatozoides de donadores sanos y en pacientes fumadores y no fumadores, demostrando que los pacientes infértiles que eran fumadores presentaban una mayor cantidad de esta caspasa, en comparación con los otros grupos; esta condición se exacerbaba de manera significativa en aquellas personas excesivamente fumadoras, lo que quiere decir que tenían alrededor de 17 años siendo adictas y consumiendo por lo menos 23 cigarros al día (El-Melegy y Ali, 2011). Esto puede deberse a una desregulación en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo o a la hipoxia leve causada por la disrupción de la microcirculación testicular, pero un efecto tóxico de los compuestos químicos del cigarro sobre el epitelio testicular está más relacionado, aunado a un impacto adverso provocado por las ERO en los espermatozoides, las cuales pudieran ser las causantes del daño ligado a la baja concentración de antioxidantes (El-Melegy y Ali, 2011).

A pesar de que en muchos estudios se hace la comparación entre hombres sanos e infértiles, los infértiles no tienen una patología asociada a su infertilidad como el varicocele. Éste se caracteriza por una dilatación anormal y retrógrada del fluido sanguíneo en las venas testiculares, condición que provoca infertilidad (Tsili *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que esta condición favorece un aumento en la cantidad de caspasa 9 en los espermatozoides. El estrés oxidante es uno de los probables causantes del daño en estos espermatozoides, ya que se ha propuesto que durante el varicocele se genera esta condición de estrés (Zalata *et al.*, 2011).

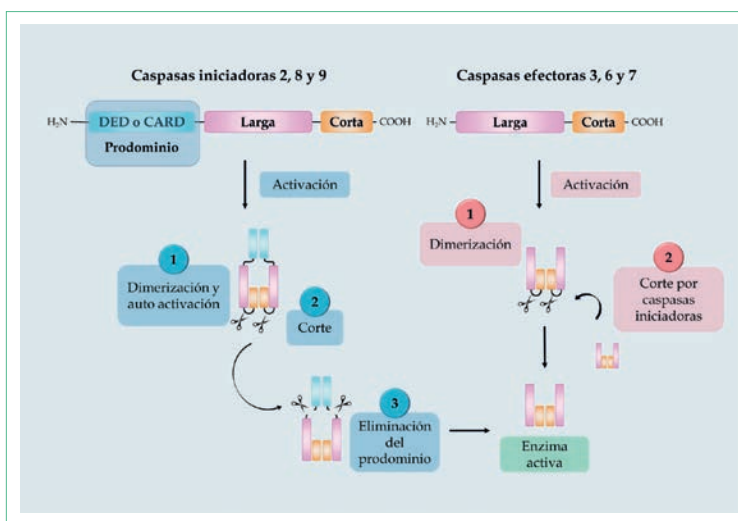
Otras investigaciones relacionan a las caspasas con el estatus maduracional de los espermatozoides, las cuales se basan en la separación de espermatozoides a través de centrifugación en un gradiente de concentración, obteniendo una fracción que se consideraron como espermatozoides maduros (los espermatozoides encontrados en la interfase entre el gradiente de 47% y 90%) e inmaduros (los

localizados sólo en el gradiente de 90%); en ambos casos se les determinó la cantidad de caspasas 9, 8 y 3, encontrando una mayor cifra en los inmaduros (Paasch *et al.*, 2003). Lo anterior puede deberse a una maduración incompleta durante su tránsito por el epidídimo (Paasch *et al.*, 2003).

6. Conclusión

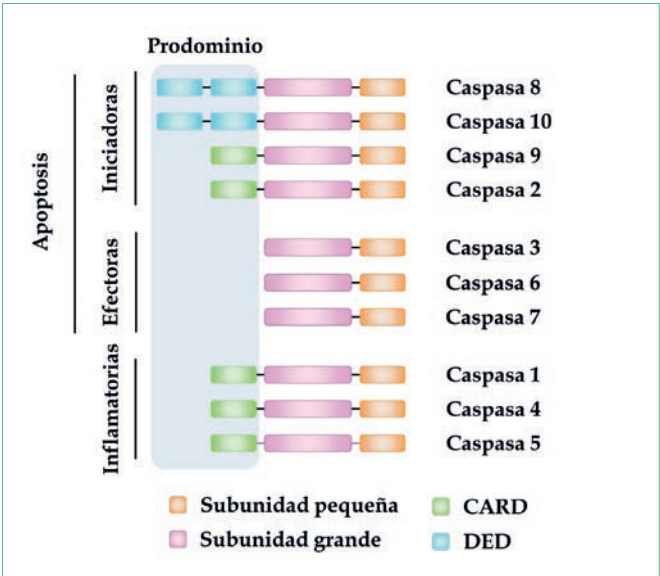
A pesar de que diversos estudios asocian la mala calidad espermática con la presencia de caspasas (1, 3, 9, 8), estos análisis no son concluyentes, ya que se desconocen las vías de señalización en las que participan específicamente en espermatozoides; además, se debe considerar que se ignora qué ocurre con estas proteínas cuando el espermatozoide transita por el epidídimo. Por lo que es necesario realizar más estudios que ayuden a esclarecer el papel de las caspasas en la fisiología espermática durante su formación y maduración posttesticular.

Figura 1. Estructura y proceso general de activación de caspasas iniciadoras y efectoras.



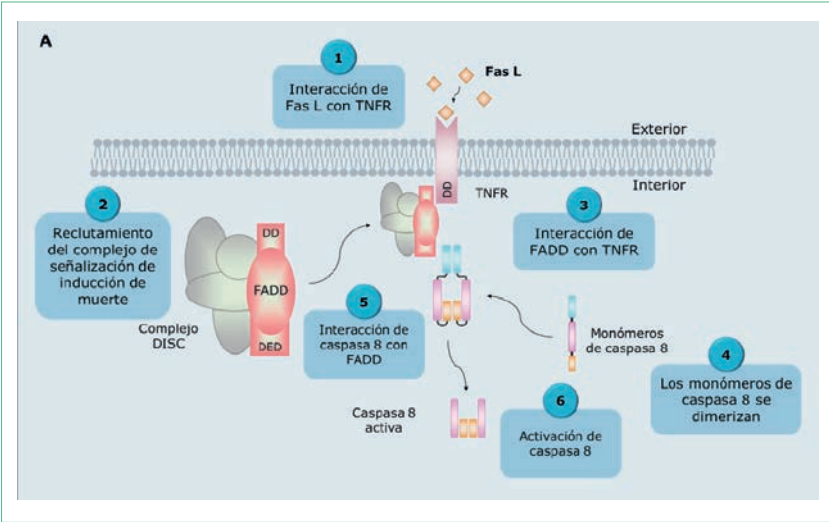
Autora: Blanca Patricia López-Trinidad.

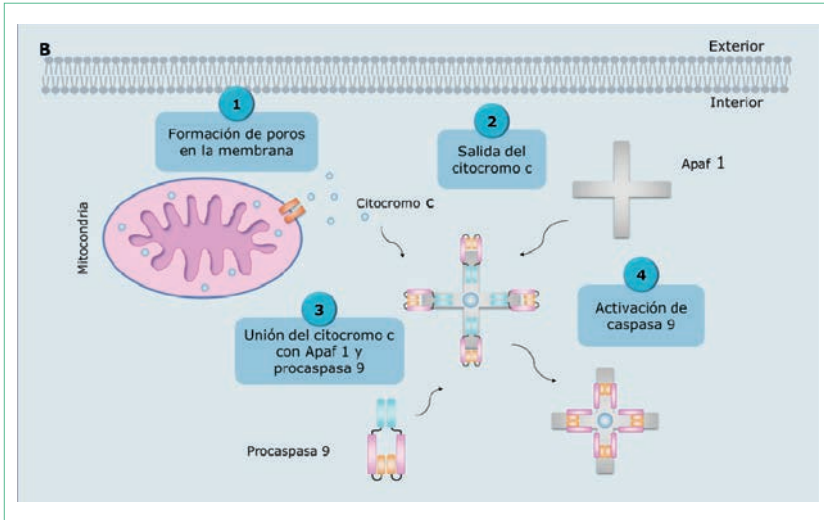
Figura 2. Representación de los diferentes tipos de caspasas.



Autora: Blanca Patricia López-Trinidad.

Figura 3. Esquematización de la vía de activación general de algunas caspasas.





Autora: Blanca Patricia López-Trinidad.

Referencias

- Arenas-Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., López-Trinidad, B. P., Sandoval, F. M. R., Tobón, E. R., Jiménez-Salazar, J. E. y León-Galván, M. A. (2014). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(7), 73-81.
- Bejarano, I., Lozano, G. M., Ortiz, A., García, J. F., Paredes, S. D., Rodríguez, A. B. y Pariente, J. A. (2008). Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertility and Sterility*, 90(4), suplementario, 1340-1347. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028207034656>
- Cade, C. E. y Clark, A. C. (2015). Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances. En Kakoli Bose (eds.), *Caspases—Key Players in Apoptosis* (pp. 31-51). Cham: Springer International Publishing.
- Demaurex, N. y Distelhorst, C. (2003). Cell biology. Apoptosis-the calcium connection. *Science*, 300(5616), 65-67.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. y Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- El-Melegy, N. T. y Ali, M. E. (2011). Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol*, 37(4), 495-506.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Frasch, S. C., Henson, P. M., Kailey, J. M., Richter, D. A., Janes, M. S., Fadok, V. A. y Bratton, D. L. (2000). Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*, 275(30), 23065-23073.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D. y Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22(1), 58-73.
- Green, D. R. y Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(12), 1-24.
- Grunewald, S., Kriegel, C., Baumann, T., Glander, H. J. y Paasch, U. (2009). Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 24(9), 2071-2078.
- Grunewald, S., Paasch, U., Wuendrich, K. y Glander, H. J. (2005). Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Arch Androl*, 51(6), 449-460.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. y Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3-11.
- Kuhlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13(89), 1-11.
- Lin, C. y Zhang, J. (2017). Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer. *Frontiers in Immunology*, 8(271), 1-22.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. y Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391.

- McIlwain, D. R., Berger, T. y Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), 1-28.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S. y Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. En A. Ashkenazi, J. Yuan y J. A. Well (eds.), *Methods in Enzimology*, (pp. 99-128). Burlington: Academic Press.
- Paasch, U., Agarwal, A., Gupta, A. K., Sharma, R. K., Grunewald, S., Thomas, A. J., Jr. y Glander, H. J. (2003). Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 486-488.
- Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A. y Glander, H. J. (2004). Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 81(1), 802-809.
- Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G. y Glander, H. J. (2003). Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl*, 24(2), 246-252.
- Parrish, A. B., Freel, C. D. y Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6), 1-24.
- Schultz, D. R. y Harrington, W. J. Jr. (2003). Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 32(6), 345-369.
- Soares, S. R. y Melo, M. A. (2008). Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 20(3), 281-291.
- Tsili, A. C., Xiropotamou, O. N., Sylakos, A., Maliakas, V., Sofikitis, N. y Argyropoulou, M. I. (2017). Potential role of imaging in assessing harmful effects on spermatogenesis in adult testes with varicocele. *World J Radiol*, 9(2), 34-45.
- Weng, S. L., Taylor, S. L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E. H., Beebe, S. y Oehninger, S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8(11), 984-991.
- Zalata, A., El-Mogy, M., Abdel-Khabir, A., El-Bayoumy, Y., El-Baz, M. y Mostafa, T. (2011). Sperm caspase-9 in oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. *Fertil Steril*, 96(5), 1097-1099.
- Zhang, J.-M. y An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37.

Glosario

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Polinucleótido formado por la unión covalente entre unidades de desoxirribonucleótidos; actúa como transportador de la información genética.

Apaf 1: Proteasa activadora del factor 1 de la apoptosis.

bp: Pares de bases.

CAI: caspasas apoptóticas iniciadoras.

CAE: caspasas apoptóticas efectoras.

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas (caspase recruitment domain).

DED: Dominio efector de muerte (death effector domain).

DIABLO: Proteína de unión directa a IAP con bajo pI (direct IAP-binding protein with low pI).

DISC: complejo de señalización de inducción de muerte.

DD: Dominio de muerte.

FADD: Proteína asociada a Fas con dominio de muerte (Fas-associated protein with death domain).

FasL: Ligando de Fas.

HtrA2/Omi: Serina peptidasa mitocondrial
HtrA2, también conocido como Omi.

IAP: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

PS: Fosfatidilserina.

Pro-IL-1B: Precursor de la interleucina 1 B.

Smac: Segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias (second mitochondria-derived activator of caspases).

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral.

TRADD: Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 asociado al dominio de muerte (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain).

CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO Y EL ESPERMATOZOIDE DE LAS SERPIENTES

Gisela Fuentes Mascorro,^{1*}
Agustín Álvarez Trillo,²
Dioseline Girón Gutiérrez,³
Pablo Rogelio Simón Salvador,³
Mayra Bautista Medel³ y
Héctor David Tamayo Martínez¹

^{1*} Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA), Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Correo electrónico: lirauabjo@gmail.com

² Herpetario Reptilium

³ Tesista de Licenciatura del LIRA.

1. Introducción

México es uno de los países megadiversos, cuenta con 393 grupos de serpientes (Paredes-García *et al.*, 2011; Flores-Villela y García-Vázquez, 2014). Esta riqueza ha formado parte de la cosmovisión de las culturas prehispánicas del país, en particular entre los aztecas, quienes representaron a Quetzalcóatl con una serpiente con aureola de plumas y cuerpo ondulante cubierto también de plumas cuya cola culmina con los típicos anillos (Bueno, 2000), y los mayas plasmaron con esta misma figura al dios Kulkán en la pirámide de Chichén Itzá, que durante el equinoccio de primavera la luz del Sol ilumina la escalinata, formando el cuerpo de la serpiente que baja hasta la base de la pirámide, donde se une a la cabeza de un crótalo (Ojeda, 2004, en Fuentes-Mascorro *et al.* 2015). En la fachada del palacio del gobernador en Uxmal se encuentra lo que puede ser considerado como el primer modelo de geometría natural, que toma los rombos de la piel de la serpiente de cascabel como patrón; para los mayas, además, este rombo significa certidumbre matemática, de allí proviene el concepto de cielo cuadrado, las cuatro fases de la luna y los puntos cardinales (Bueno, 2000). En la iconografía y la arquitectura olmeca, maya, zapoteca y azteca, así como en el escudo nacional, la serpiente que se aprecia es del género crótalo (Fuentes-Mascorro, 2014).

De acuerdo con Gómez *et al.*, 2005, se expende sin ningún control sanitario o de origen carne y cápsulas que en teoría son de serpiente de

cascabel, con la promesa de que combate el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y cáncer; Camacho-Escobar *et al.* (s/f) indican que en la costa de Oaxaca la carne de *Crotalus aquilus*, molida y disuelta en agua, es empleada para tratar la enfermedad de Newcastle en guajolotes (*Meleagris gallopavo*). Si a esto le sumamos que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cada año se producen 5.4 millones de mordeduras, que causan de 1.8 a 2.7 millones de casos de envenenamiento y de 81,410 a 137,880 muertes (Siria y Arellano, 2009), las serpientes venenosas son sacrificadas en busca de su carne y por la interacción con los seres humanos, pues el accidente ofídico se ha tornado un problema de salud pública y ha colocado a algunas de las especies en la categoría de sujetas a protección o amenazadas, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010.

En los últimos años, el incremento de la herpetofilia ha provocado el desplazamiento de especies muy lejos de los lugares donde habitaban originalmente, incrementando con esto la necesidad de producir faboterápicos no sólo para las especies de distribución local, sino también para las que llegan a los países a través del mercado legal y del comercio ilegal. El decomiso de estos ejemplares y su puesta en resguardo facilita la obtención del material biológico necesario para producir antídotos, además de permitir el estudio y aislamiento de proteínas para su posible empleo como fármacos, lo que cobra un nuevo e interesante sentido a partir de la publicación de los estudios de Casewell *et al.*, 2012, quienes encontraron la anidación de genes que codifican para proteínas con roles fisiológicos dentro de los clados de las toxinas del veneno.

El Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA) de la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca (UABJO), en colaboración con el Herpetario Reptilium y el Zoológico de Zacango, ha mantenido en los últimos años una línea de investigación enfocada en la aplicación de técnicas de reproducción asistida en reptiles, orientadas en un inicio a la conservación de semen para su posterior uso en la inseminación artificial de hembras que se encuentran lejos del ejemplar macho. En las siguientes páginas se presentan los avances que se han tenido.

2. Técnica de extracción de semen (Fuentes-Mascorro y Álvarez, 2016)

Una vez observada la conducta de apareamiento en elápidos vipéridos y colúbridos, se diseñó una técnica que permite extraer semen en ejemplares de estas tres subclases. Básicamente consiste en la contención del animal por personal capacitado; por seguridad de quien hace la contención y del ejemplar, se maneja en un tubo herpetológico transparente, donde se introduce el tercio anterior de su cuerpo, asegurando su no retorno. El técnico que realiza la extracción procede a dar un masaje ventral cráneo-caudal en el tercio distal del cuerpo del ejemplar y circular en el área del esfínter cloacal y en los esfínteres de acceso a las bolsas de los hemipenes; una vez que la serpiente relaja los esfínteres, se procede a introducir diluyente a 28°C en la cloaca y los sacos de los hemipenes, acto seguido se ejerce presión sobre la región para que expulse el líquido (no siempre retorna el líquido de la cloaca, en ocasiones el animal lo retiene o lo absorbe), con papel suave se retira el exceso de líquido. Los machos que están o han estado en actividad sexual arrojan un material gelatinoso de los sacos de los hemipenes y da inicio la expulsión de líquido que contiene espermatozoides; el eyaculado puede tener consistencia de pastosa a líquida y los espermatozoides presentes en él no siempre tienen movimiento. Bajo esta técnica en ejemplares en actividad sexual se ha logrado obtener hasta 30 improntas, cabe considerar que no es necesario que el ejemplar evierta los hemipenes para eyacular.

Es muy probable que el material gelatinoso que sale de los sacos de los hemipenes corresponda a semen que ha sido eyaculado a pesar de la ausencia de la hembra y que pase por el conjunto de surcos que comunican la cloaca con las bolsas de los hemipenes. Este material puede ser blanco, amarillento o grisáceo si tiene mucho tiempo en el lugar, se puede encontrar en la entrada de los sacos de los hemipenes seco y adherido a la piel del ejemplar; de ser así, se recomienda retirarlo humedeciéndolo con líquido tibio para evitar erosionar la piel.

3. Evaluación macroscópica

El eyaculado de las serpientes se emite por ondas de eyaculación; cuando el macho está copulando con la hembra se registra una fase de estimulación. En crótalos, la hembra se queda quieta y el macho, una vez que ha hecho la intromisión del hemipene en la cloaca de la hembra, avanza reptando sobre el cuerpo de ella, realizando un movimiento lateral con la cabeza hacia ambos lados; cuando llega a la altura de la cabeza de la hembra, regresa su cuerpo y eyacula, e inicia otra sesión de estimulación, una cópula puede durar hasta 18 horas. Cuando se extrae el semen de los machos, se estimula al ejemplar simulando la sensación que tendría de estar reptando sobre la hembra y eyacula una gota de semen, que puede ser de traslúcida a blanca lechosa, con una consistencia de líquido a mucoso, de un volumen muy bajo; luego se realiza una nueva sesión de estimulación y así sucesivamente. En ejemplares de colúbridos, la cópula se efectúa entrelazándose los ejemplares desde el tercio medio hasta el tercio posterior, el macho introduce el hemipene en la cloaca de la hembra y desliza su cuerpo entrelazándolo al de la ella para completar un “abrazo nupcial”, eyaculando como acto seguido; relaja el cuerpo que se mantiene entrelazado y se repite la estimulación, proceso bajo el que se han logrado hasta 20 eyaculados por sesión. El eyaculado es traslúcido y como máximo se ha obtenido una cantidad de 250 μ L. Cuando estos animales no se encuentran en época reproductiva, no eyaculan.

En la mayoría de las ocasiones los eyaculados se colectan por impronta en un portaobjetos temperado a 28°C, se confirma por observación en el microscopio que la impronta contenga espermatozoides, se vierten 10 μ L del diluyente que se esté empleando en la laminilla, se mezclan con una punta y se transfiere el eyaculado diluido a un tubo eppendorf para su posterior procesamiento. Cabe hacer notar que cuando el eyaculado es espeso no coagula como el de los humanos, por lo que de no diluirse se seca; si la impronta no se diluye rápidamente, también se seca. Colúbridos, vipéridos y elápidos pueden eyacular espermatozoides sin movimiento, que a la tinción eosina-nigrosina están vivos; se ha observado que una vez

que están diluidos, con el tiempo empiezan a presentar movimiento y que de manera indistinta en el eyaculado pueden salir espermatozoides con y sin movimiento, sin ningún patrón. El pH se ha determinado empleando tiras reactivas, obteniéndose en todos los ejemplares 7.0 como valor, dato que debe tomarse con reserva en virtud de que las tiras reactivas son poco sensibles y la escala de pH es logarítmica.

4. Evaluación microscópica

Movilidad masal es la forma en que los espermatozoides se mueven en grupo; se coloca el portaobjetos que tiene la impronta en el microscopio y se enfoca con el objetivo de 10X: se asigna un 5 cuando los espermatozoides se desplazan en grupos, formando remolinos vigorosos similares a los de un cardumen en movimiento; 4 a remolinos con menor vigor; 3 cuando no hay remolinos, pero sí movimiento grupal; 2 si existe movimiento en grupos de pocos espermatozoides; 1 cuando la actividad en grupos se reduce a unos cuantos espermatozoides en movimiento y 0 sin movimiento. De acuerdo con esta escala, los eyaculados de animales en plena estación reproductiva presentan una movilidad masal de 5.

Se encontró un movimiento cooperativo en los espermatozoides de *Crotalus atrox* que consiste en grupos de cientos de ellos que coordinan su batido flagelar para avanzar en una misma dirección (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2013), fenómeno que ha sido reportado en *Parachauliodes japonicus* (Hayashi, 1998) y en *Ratus norvegicus* (Pizzari y Foster, 2008); los videos que se han grabado contienen imágenes similares (fig. 1) a las del artículo de Moore *et al.*, 2002.

Morfología. El espermatozoide de los reptiles presenta una forma característica (fig. 2), distinguiéndose una cabeza y flagelo; en la parte anterior de la cabeza se ubica el acrosoma que termina en punta, inclinada a la derecha o a la izquierda y anterior a ella, antes de la fosa de implantación se ubica el núcleo, que presenta en conjunto con el acrosoma la forma de

una pirámide, se continúa con una pieza media que es muy larga y finaliza en una cola que parece estar desnuda de membrana, como sucede en los espermatozoides de mamíferos.

Reuniendo la información de las anormalidades observadas a lo largo de cuatro años de evaluación de eyaculados de serpientes, se ha encontrado que, del cien por ciento de anormalidades, la cabeza presenta 21.76%, el flagelo 30.57%, con dos o más anormalidades el 47.67%. Las cabezas dobladas e hinchadas son el tipo de anormalidad presentada y en el flagelo se observó forma de ovillo, doblado sobre sí, desviaciones angulares en ondas, enrollado y la presencia de dos colas, algunos presentan la cabeza hinchada y la cola doblada. En las figuras 3 a 8 se presentan algunas de las anormalidades encontradas.

En la fotografía 9 se aprecia el núcleo, la fosa de implantación o cuello, parte de la vaina mitocondrial y las fibras densas del flagelo; la membrana se nota delgada y lábil a las técnicas empleadas para su procesamiento. La figura 10 muestra la estructura de la pieza media o pieza principal del flagelo, con una membrana plasmática bien definida, el agrupamiento de mitocondrias que la caracteriza y la vaina fibrosa. En la figura 11 se puede apreciar la diferencia entre la pieza media y la cola o pieza final del flagelo, que no está rodeada por la membrana celular.

Vivos-muertos. Manejar los datos de espermatozoides vivos y muertos representó algunas dificultades sustanciales. Con la tinción de eosina-nigrosina ocupada en mamíferos (Campbell *et al.*, 1956), los espermatozoides de las serpientes empezaron a presentar inconvenientes como los que se muestran en las figuras 7 y 8, por lo que primero se realizó un estudio de osmolaridad con soluciones de 200, 300, 400 y 500 mOsm/L en *Crotalus molossus*, *Crotalus atrox* y *Crotalus culminatus*; se encontró estrés osmótico en todas las soluciones, sin diferencias entre especies, notándose que los espermatozoides responden a osmolalidades de 200, 400 y 500 mOsm/L, incrementando el volumen de la región que corresponde al núcleo y manteniéndose intacto el acrosoma (Simón-Salvador *et al.*, 2016).

La osmolaridad de los espermatozoides de *Boa constrictor*, *Morelia spilota*, *Pituophis deppei*, *Crotalus culminatus* y *Crotalus molossus*, empleando soluciones de Tyrode modificado a 420, 440, 460 y 480 mOsm/L, evaluando a 0, 12, 24 y 36 horas de conservación a temperatura de 28°C; se midió el porcentaje de hinchamiento (PH) en los espermatozoides y los resultados mostraron para *Pituophis deppei* que 460 mOsm/L conserva los espermatozoides en perfecto estado desde el tiempo 0 hasta 48 horas; para *Boa constrictor*, 420mOsm/L presenta valores de 0 PH, para 0, 12 y 48 horas; *Morelia spilota* presenta los mejores resultados a 420 y 460 mOsm/L; *Crotalus culminatus* presenta los porcentajes más bajos de hinchamiento (2 a 40%) entre 460 y 480 mOsm/L, y para *Crotalus molossus* las cuatro osmolaridades parecen apropiadas, en virtud de que los PH van de 0 a 49; por la osmolaridad de la solución adecuada, depende del tiempo durante el cual se requiere conservar la muestra (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2015).

El espermatozoide de las serpientes responde con hinchamiento de la cabeza tanto a estrés hipoosmótico como hiperosmótico (fig. 12), por lo que actualmente se está buscando la distribución de acuaporina. En la figura 13 se advierte la presencia de acuaporina 1 en la región del acrosoma, debido a que estas proteínas son capaces de permitir la entrada o salida de agua en contra del gradiente osmótico.

Diluciones. Para conservar los espermatozoides en movimiento a 28°C (temperatura cloacal de las hembras del mismo género), se evaluó la eficiencia de diluyentes que son empleados de manera rutinaria para preservar espermatozoides de *mamíferos*; se extrajo semen del género *crotalus* de las especies *atrox*, *basiliscus*, *culminatus*, *m. nigrescens*, *m. oaxacus*, *ravus*, *simus* y *scutulatus*, se diluyeron los eyaculados en 10 µL de la solución correspondiente, se mantuvieron en tubos eppendorf, en baño seco, y se evaluó la movilidad masal cada 30 minutos usando la escala de 0 a 5 antes mencionada (tabla 1; Fuentes-Mascorro *et al.*, 2014); el tiempo más largo de conservación de la movilidad de los espermatozoides

se presentó con el medio Tyrode modificado, que está constituido por el Tyrode comercial suplementado con albúmina bovina 5mg/mL.

Medidas de los espermatozoides. Se trabajó con tres ejemplares de vida libre: un *Stenorrhina freminvillei*, con un peso de 42 gramos y talla de 42.5 cm de largo total; un *Coluber mentovarius*, con un peso de 400 gramos y medida de 107.7 centímetros, y una *Boa constrictor* que pesaba 2,400 gramos y talla de 157 centímetros, los cuales fueron capturados por interacción con los humanos; el *Crotalus molossus oaxacus*, que se tomó del Herpetario Reptilium, ejemplar de 750 gramos, en cautiverio, con temperatura constante de 25°C y una humedad de 47 a 63%; se obtuvieron cinco eyaculados por ejemplar para la evaluación y se midieron 200 espermatozoides por cada uno con el programa motic 2.0, los resultados se muestran en la tabla 2.

El ejemplar de *Boa* se encontraba al final de la estación reproductiva. Los índices morfo-espermáticos indican que los espermatozoides de cabezas pequeñas presentan rangos altos, como el caso de *Stenorrhina*, que es el de menor talla adulta, no encontrándose ninguna relación entre el largo adulto esperado de los géneros evaluados y el de los espermatozoides que producen.

5. Conclusión

El eyaculado de las serpientes surge en ondas, acompañadas de una fase de estimulación que continúa con la expulsión del esperma, el cual es expelido en volúmenes muy pequeños con una variedad de consistencia desde líquida hasta mucosa, de translúcido hasta blanco lechoso. Debido a que los hemipenes no presentan una función eyaculatoria, no es necesaria su eversión, pues el eyaculado es guiado a través del surco medio de los hemipenes. Evaluar el eyaculado mediante las técnicas rutinarias es posible ajustando la osmolaridad correspondiente a cada género y especie. El espermatozoide de los reptiles tiene una forma característica conservada y bajo las condiciones adecuadas de osmolaridad es posible mantenerlo viable en dilución para transportarlo.

Tabla 1. Movilidad masal

ESPECIE DE CROTALUS	TYRODE MODIFICADO 6 h Brackett y Oliphant, 1975)	TYRODE® 3 h	MAGAPOR® 1.5 h	MR-A® 3 h	BRACKETT 1.5 h
<i>atrox</i>	5/2	4/1	5/0	5/1	5/2
<i>basiliscus</i>	5/2	5/1	4/0	4/0	4/0
<i>culminatus</i>	4/2	4/1	4/0	5/0	5/0
<i>m. nigrescens</i>	5/2	5/1	5/1	5/0	5/1
<i>m. oaxacus</i>	4/2	4/1	4/0	4/0	4/0
<i>ravus</i>	4/2	5/1	4/0	4/0	5/0
<i>simus</i>	4/2	5/1	4/0	4/0	5/0
<i>scutulatus</i>	5/2	4/1	4/0	4/0	5/0

Se evaluó con la escala de 0 a 5. En la fila superior se indica el diluyente y el tiempo en el que se terminó la evaluación, el número a la izquierda de la línea diagonal señala la movilidad inicial y el del lado derecho la movilidad final en el tiempo establecido en la primera fila.

Tabla 2. Evaluación y medidas de los espermatozoides

Parámetro	<i>Stenorrhina</i>	<i>Coluber</i>	<i>Boa</i>	<i>Crotalus</i>
Movilidad masal	5	5	1	5
% espermatozoides vivos	84	97.5	58	74.5
% espermatozoides muertos	16	2.5	42	25.5
% espermatozoides normales	100	100	100	100
Largo cabeza epz μm	14.6 $\pm$ 0.55	19.1 $\pm$ 1.3	16.4 $\pm$ 3.22	18.22 $\pm$ 1.81
Largo flagelo epz μm	164.30 $\pm$ 2.22	113.5 $\pm$ 8.7	156.84 $\pm$ 6.71	109.5 $\pm$ 6.0
Largo total epz μm	178.9 $\pm$ 2.53	132.6 $\pm$ 9.42	173.26 $\pm$ 7.75	127.7 $\pm$ 4.80
Índice morfo-espermático	11.3	5.9	9.8	6.13

Se emplearon cinco eyaculados por ejemplar. El índice morfo-espermático es el cociente del largo del flagelo entre el largo de la cabeza; %= porcentaje; epz = espermatozoides.

Figura 1. Conjunto de espermatozoides de *C. atrox* atrapado en tejido de descamación; sincronizan el batido de sus flagelos para impulsarse de manera coordinada e incrementar el efecto del movimiento, la parte más oscura corresponde al conjunto de cabezas 40X.



Figura 2. Espermatozoide de *Crotalus spp.* Se aprecia la cabeza que presenta el núcleo teñido de azul y el acrosoma translúcido, el flagelo con una pieza media extremadamente larga y una cola final aparentemente desnuda 40X.



Figura 3. Espermatozoides de *C. molossus nigrescens* teñidos con fuccina básica a 40X, se aprecia la ausencia de cabezas.

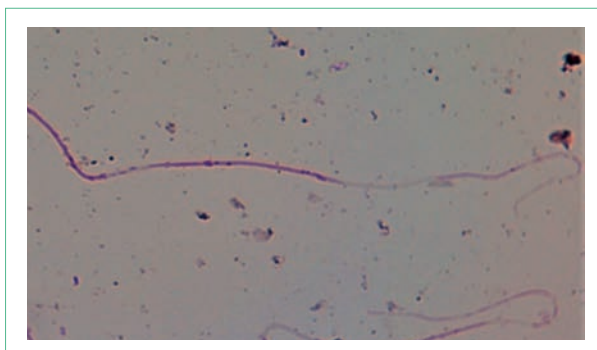


Figura 4. Espermatozoides de *C. molossus oaxacus* teñidos con fuccina básica a 40X. Las flechas azules señalan defectos en la fosa de implantación.

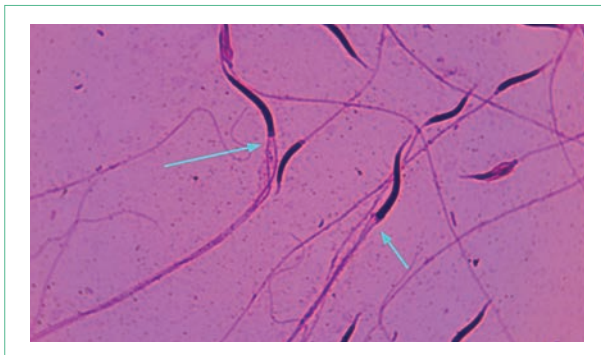


Figura 5. Espermatozoides de *C. ravus ravus* teñidos con hematoxilina a 40X. Se advierte pieza media doblada en la parte superior; a la izquierda, cola doblada y abajo, flagelo doblado sobre sí, formando un ocho.

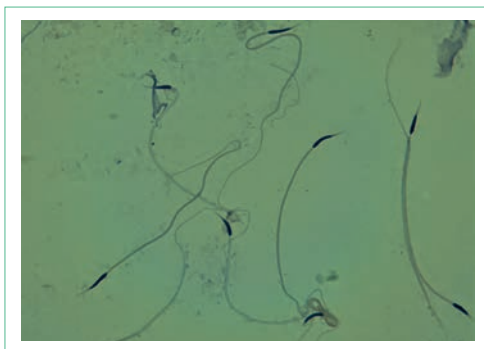


Figura 6. Espermatozoides de *Stenorrhina f.* Tinción eosina-nigrosina, con filtro a 40X. Se aprecian cabezas hinchadas en la parte superior derecha, al igual que agrupamiento de espermatozoides; conforme se va secando la muestra tienden a asociarse en formación.

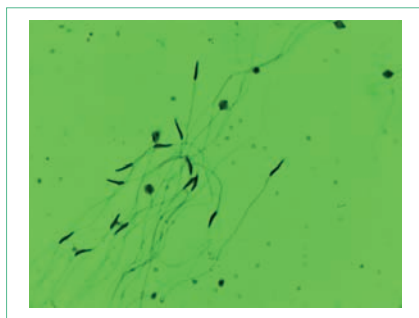


Figura 7. Espermatozoides de *C. molossus nigrescens* teñidos con eosina-nigrosina. Se distingue en el espermatozoide inferior la cabeza deforme y dos colas al final del flagelo.



Figura 8. Espermatozoides *Crotalus* spp. Tinción eosina-nigrosina a 40X, con acercamiento de la cámara. Se aprecia diferente grado de hinchamiento de la cabeza.



Figura 9. Fotomicrografía electrónica de transmisión. La flecha marca una membrana plasmática delgada, electrodensa e irregular, que se extiende hasta la parte media. El núcleo (N) alargado y electrodenso. El cuello del espermatozoide (CE). Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 12 000X.

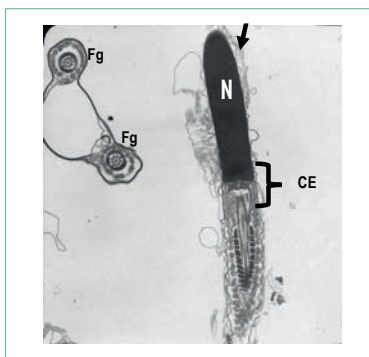


Figura 10. Fotomicrografía electrónica de transmisión. Pieza media (PM) o parte principal. Membrana celular (MC) electrodensa, mitocondrias (M) y vaina fibrosa (Vf). Técnica de contraste de uranilo y citrato de plomo. Aumento 7 000X.

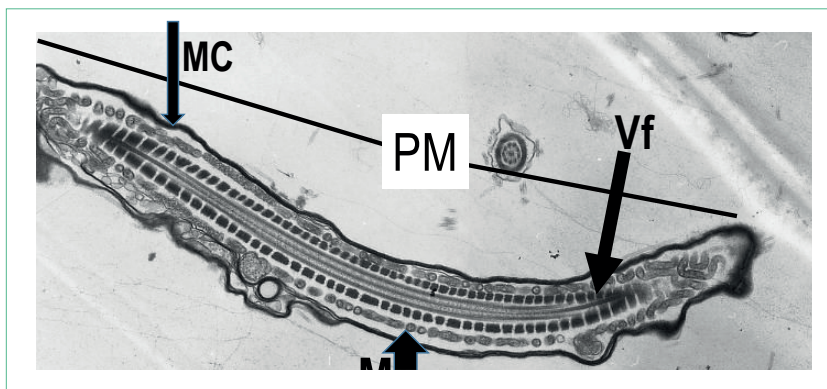


Figura 11. (PF) o cola, se observa el axonema rodeado por fibras densas externas electrodensas, un corte transversal de pieza media (PM) rodeada de mitocondrias (M). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 12 000X.

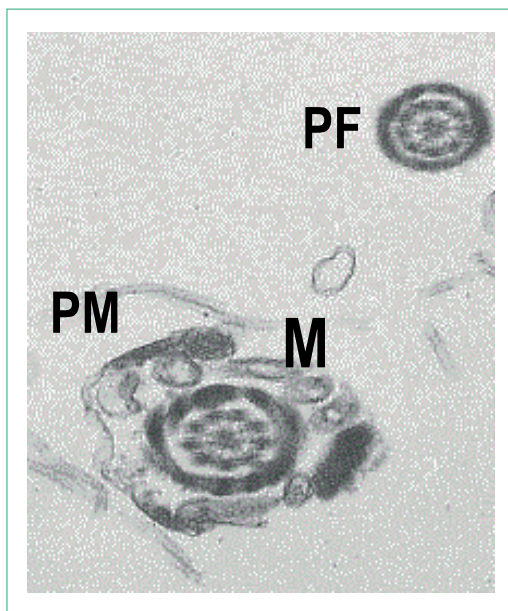


Figura 12. Espermatozoides de *Crotalus spp* teñidos con rodamina B y yoduro de propidio microscopía confocal; se puede apreciar la heterogeneidad de las cabezas, lo largo de la pieza media y la integridad del acrosoma, a pesar del hinchamiento del núcleo, por lo que pudiera tratarse de descondensación del ADN.

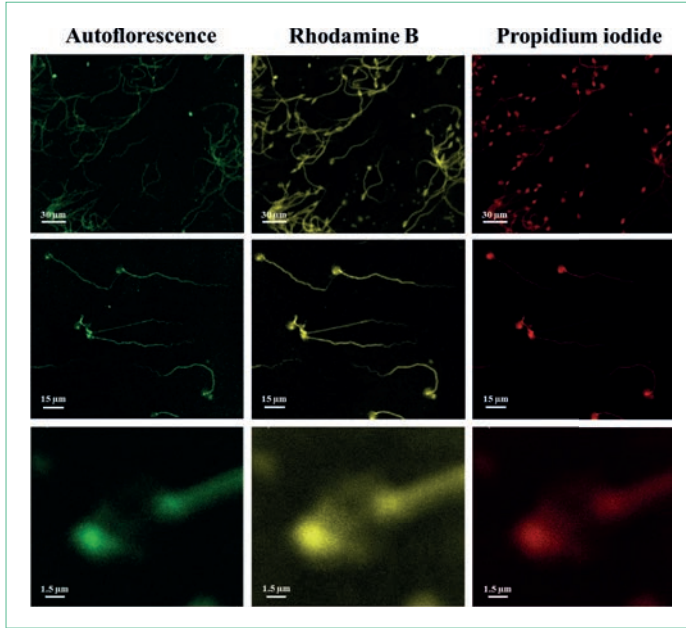
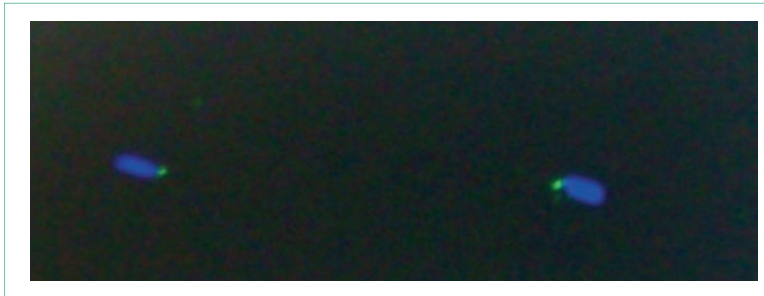


Figura 13. Microscopía de fluorescencia. El núcleo se aprecia en color azul (Hoechst) y con verde se distingue el anticuerpo que se une a la acuaporina 1.



Referencias

- Brackett, B. G. y Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
- Bueno, S. (2000). *La geometría como categoría analítica en el arte*. Argentina. Recuperado de <http://201.147.150.252:8080/jspui/bitstream/123456789/1135/1/LaGeometr%C3%ADa-como-categor%C3%ADa%20anal%C3%ADtica-en-el-Arte.pdf>
- Camacho-Escobar, MA., Arroyo-Ledezma, J, García-Bautista, Y. y Pérez-Lara, E. (s/f). Medicina alternativa aplicada al guajolote nativo (*Meleagris gallopavo*) en la Costa de Oaxaca. Recuperado de <http://bibliotecas.umar.mx/publicaciones/MEDICINA%20ALTERNATIVA%20UTILIZADA%20PAR97%20A%20GUAJOLOTE.pdf>
- Campbell, R.C., Dott, H.M. y Glover, T.D. (1956). Nigrosin eosin as stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.*, 48, 1-8.
- Casewell NR, Huttley GA y Wüster W. (2012). Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles. *Nature communications*. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/ncomms2065>
- Duchi, D.N., Almela, V.L., Peinado, R.B. y Poto, R. A. (2009). Extracción y valoración de la calidad de semen del palomo deportivo Murciano (*Columba livia*). *Arch. Zootec.*, 58(1), 537-540.
- Flores-Villela, O. y García-Vázquez, V. O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 467-475.
- Fuentes-Mascorro, G. (2014). La serpiente de cascabel como recurso zoogenético. *Revista AICA*, 4, 303-304.
- Fuentes-Mascorro, G., Álvarez ,T.A., Bautista, M.M. y Girón, G.D. (2013). Movilidad cooperativa en espermatozoides del género *Crotalus*. *Memorias XXX Simposio sobre Fauna Silvestre "Gral. MV. Manuel Cabrera Valtierra"* (pp. 168-170). México: UNAM.
- Fuentes-Mascorro, G., Álvarez A., Bautista M.M., Girón G.D. y Ramírez A.L.M. (2014). Diluciones como método de conservación de semen del género *Crotalus*. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4, 97-99.
- Fuentes-Mascorro, G., Simón-Salvador P.R., Tamayo-Martínez H.D. y Álvarez T.A. (2015). Osmolaridad del espermatozoide de los reptiles. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 6, 218-225.
- Fuentes-Mascorro, G. y Álvarez T.A. (2016). Extracción de semen en serpientes. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 1- 4.
- Gómez, A.G., Reyes, G.S.R., Teutli, S.C. y Valadez, A.R. (2005). La medicina tradicional prehispánica, vertebrados terrestres y productos medicinales de tres mercados del Valle de México. *Etnobiología*, 102(5), 86-98.
- Hayashi, F. (1998). Sperm co-operation in the fishfly *Parachauliodes japonicas*. *Func. Ecol.*, 12, 347-350.

- Moore, H., Dvoraková, K., Jenkins, N. y Breed, W. (2002). Exceptional sperm cooperation in the wood mpuse. *Nature*, 418, 174-177.
- Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 30 de diciembre segunda sección, 1-30.
- Paredes-García, D., Ramírez-Bautista, M. y Martínez-Morales, A. (2011). Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 70, 34-53.
- Pizzari, T. y Foster, K.R. (2008). Sperm sociality: cooperation, altruism and spite. *Plos Biology*, 5(6), 925-931.
- Simón-Salvador P.R., Álvarez T.A., Fuentes-Mascorro, G. (2016). Choque hipoosmótico en espermatozoides de víbora de cascabel. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 52-57.
- Siria, H.C.G y Arellano, B.A. (2009). Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México. Carta al editor. *Salud Pública*, 51(2), mar./abr.

EL PAPEL DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Ernesto Rodríguez Tobón,¹
Reyna Carmen Fierro Pastrana,²
Humberto González Márquez,²
Pablo Gustavo Damián Matsumura² y
Edith Arenas Ríos²

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco no. 186, col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, México. Correo electrónico: rotoern@hotmail.com

² División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I, Unidad Iztapalapa, México.

1. Introducción

La última pieza de la reproducción sexual es la fusión entre los gametos masculino y femenino para la generación de un nuevo individuo, lo que involucra procesos orquestados por el sistema neuroendocrino y, en el caso particular del espermatozoide, la preparación para estar plenamente apto para la fertilización, que termina en el tracto reproductor femenino (O'Donnell *et al.*, 2006).

La producción de gametos masculinos ocurre en el testículo, a través de un proceso conocido como espermatogénesis. Posteriormente ingresan al epidídimo para completar su maduración, mediante cambios estructurales y funcionales para que alcancen la capacitación y la reacción acrosomal (RA) en el tracto reproductor femenino y concluir con la fertilización (O'Donnell *et al.*, 2006; Cunningham y Klein, 2003).

Después de que los espermatozoides recorrieron el *caput* y el *corpus* del epidídimo, se almacenan en la *cauda*, antes de ser eyaculados. Se ha reportado que el tránsito por el epidídimo del cerdo es de aproximadamente nueve días (Shalender Bhasin, 2006; Franca y Cardoso, 1998). La eyaculación es provocada por el sistema nervioso central, promoviendo que las fibras musculares que rodean al epidídimo expulsen a los espermatozoides por el conducto deferente hacia la uretra, junto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, formando el semen (Shalender Bhasin, 2006).

Los espermatozoides tienen que pasar por la capacitación y la RA previo a poder fertilizar al óvulo. En humanos, este proceso parece estar regulado, en parte, por reacciones de óxido-reducción (De Lamirande y Gagnon, 1998; De Lamirande y Gagnon, 2003) donde participan las especies reactivas del oxígeno (ERO). Los espermatozoides, al igual que otras células en condiciones aeróbicas, son capaces de producir ERO, que pueden ser nocivas para ellos mismos, provocando daños en la membrana y el ADN, además de afectar la movilidad y viabilidad espermática (Gagnon y De Lamirande, 2006; Medeiros, 2008). Sin embargo, existe evidencia que indica que la generación de las ERO (fig. 1) está implicada en la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (De Lamirande y Gagnon, 1998; De Lamirande y Gagnon, 2003). Se ha reportado que la generación de cantidades controladas de ERO, tales como el anión superóxido (O_2^-) y su producto de dismutación, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), participan en la regulación y funciones fisiológicas de los espermatozoides (De Lamirande y Gagnon, 1998; De Lamirande y Gagnon, 2003).

Si bien en estudios iniciales no se establece claramente la relación directa entre las ERO y los espermatozoides (Aitken *et al.*, 2016), existen algunas evidencias de su asociación; MacLeod (1943) reportó en espermatozoides humanos pérdida de la movilidad debido a concentraciones de oxígeno altas, implicando directamente al H_2O_2 en esta alteración. Por otra parte Tosic y Walton (1946), estudiando espermatozoides de toro, encontraron que el H_2O_2 alteró la función espermática a nivel de la respiración celular; posteriormente, Evans (1947) y sus colaboradores reportaron que la función principal del espermatozoide de erizo de mar puede verse afectada por estrés oxidante. De igual forma, Aitken y su grupo (1993) reportaron que la enzima catalasa –y no la superóxido dismutasa– era capaz de inhibir el efecto deletéreo de las ERO, particularmente del H_2O_2 . Hoy en día los estudios continúan demostrando que el estrés oxidante puede afectar procesos fisiológicos en el espermatozoide, como inhibir la capacitación y la movilidad (Morielli y O’Flaherty, 2015).

Los daños mencionados se presentaron en espermatozoides eyaculados, no obstante, también existen estudios en donde se reporta daño producido por ERO en la maduración espermática epididimaria. En 2017, Liu y O'Flaherty encontraron en la *cauda* del epidídimo de rata espermatozoides con una movilidad baja y ADN oxidado cuando se presentó estrés oxidante generado por un hidroperóxido (*tert*-BHP). En este sentido, también reportaron un aumento en la expresión de otra enzima antioxidante, la peroxirredoxina (PRDX) en la *cauda* del epidídimo, lo que demuestra que el epidídimo defiende al espermatozoide frente al estrés oxidante (Liu y O'Flaherty, 2017). Respecto de lo anterior, se ha descrito que los espermatozoides de humano, al igual que los de cerdo, tienen la característica de presentar niveles altos de ácidos grasos polinsaturados (PUFA), estas insaturaciones los hacen muy vulnerables a los radicales libres, generando peróxidos lipídicos y aldehídos, provocando como consecuencia directa la inhibición de la movilidad espermática y comprometiendo de esta forma la capacidad fertilizante del espermatozoide (Jones *et al.*, 1979; Roca *et al.*, 2005; Malo *et al.*, 2010). Por otro lado, las ERO participan en la fisiología del espermatozoide, particularmente durante la capacitación espermática, donde se han asociado con el incremento de la fosforilación de residuos de tirosina, estimulando directamente a las enzimas tirosina cinasa (TK) y adenilato ciclasa soluble (ACs) e inhibiendo a la fosfatasa de tirosina (TP) (Ford, 2004).

2. Capacitación espermática

La capacitación espermática es esencial para garantizar la fertilización del ovocito, es un proceso sumamente complejo que ocurre durante el tránsito del espermatozoide por el tracto reproductor femenino (fig. 2) (O'Flaherty, 2015; López Úbeda y Matas Parra, 2015). En este recorrido, el espermatozoide sufre cambios bioquímicos, membranales, en el metabolismo energético, así como en actividad enzimática (De Lamirande y Gagnon, 1998), cambios que sólo ocurren cuando previamente se ha llevado a cabo satisfactoriamente la

espermatogénesis (en el testículo) y la maduración espermática epididimaria (Cervantes *et al.*, 2008).

De las modificaciones que sufre la membrana plasmática destaca el reordenamiento de proteínas y lípidos, entre los que el flujo de salida de colesterol es uno de los más importantes, modulado por las secreciones del tracto reproductor femenino, que tienen una concentración de albúmina alta que adsorbe el colesterol, lo que le da fluidez a la membrana, activando los canales de bicarbonato y, posteriormente, de calcio (Vadnais y Althouse, 2011). El incremento en la concentración de estos iones en el citoplasma del espermatozoide estimula a la adenilato-ciclasa, que comienza a producir AMPc a partir de ATP. Esta producción activa a proteínas cinasas dependientes de AMPc (proteína cinasas A; PKA) (Cross, 2004), con lo cual la membrana plasmática y la membrana externa del acrosoma adquieren la capacidad de fusionarse una con otra al ser modificada su fluidez y su permeabilidad (Gadella, 2008). El resultado final de esta remodelación permite que el espermatozoide sea capaz de unirse a la zona pelúcida del óvulo y que lleve a cabo la reacción acrosomal (Rosado, 1988; Gadella, 2008).

2.1 Hiperactivación espermática

Uno de los cambios fisiológicos del espermatozoide capacitado es la hiperactivación. Esto es, su movimiento flagelar cambia de una movilidad progresiva a un mayor movimiento y flexión del flagelo, gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, así como una trayectoria irregular y tortuosa (Gagnon y De Lamirande, 2006). El motivo de la hiperactivación es que el espermatozoide debe tener el vigor suficiente para penetrar la capa de células de la granulosa y la zona pelúcida del ovocito, así como poder desplazarse en el fluido del tracto reproductor femenino, hasta que su membrana toque a la del óvulo (Tulsiani, 2006). Para esto, los espermatozoides mantienen gradientes iónicos precisos a través de su membrana plasmática, mismos que son

regulados por ATPasas dependientes de Na^+/K^+ y Ca^{2+} ; así, la alteración en la concentración iónica activa enzimas del acrosoma y enzimas relacionadas con los cambios en la movilidad (Gadella, 2008).

La inducción de la hiperactivación requiere Ca^{2+} intracelular e incremento del AMPc y del pH intracelular. La hiperactivación del espermatozoide se debe a que el Ca^{2+} se une a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, la cual se encuentra en la parte interna del flagelo (Inaba, 2003). La dineína es responsable de la conversión de energía química a partir de la hidrólisis de ATP, generando la energía mecánica necesaria para la movilidad (Gagnon y De Lamirande, 2006). El Ca^{2+} puede provenir de varios lugares, como reservas intracelulares mediadas por los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) o la mitocondria y de manera extracelular por sistemas de transporte Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Gadella, 2008). La remoción del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide también puede activar directamente canales iónicos, aumentando la concentración de Ca^{+2} intracelular (Darszon *et al.*, 2011).

De igual forma, se ha descrito la posible participación de un cotransportador de sodio y bicarbonato (NBC, por sus siglas en inglés, $\text{Na}^+/\text{Bicarbonate Cotransporter}$), probablemente activado por el Ca^{+2} extracelular, que favorece la entrada de Na^+ y HCO_3^- , donde este último resulta fundamental para la activación de la enzima ACs, que se encuentra soluble en el citosol; de esta manera aumenta la producción de AMPc (Darszon *et al.*, 2011). Asimismo, se ha reportado un canal intercambiador sodio-protón (sNHE, por sus siglas en inglés, $\text{Na}^+/\text{Hydrogen Exchanger}$) que funciona intercambiando Na^+ y H^+ , y en conjunto con un canal específico de protones (H_v) regulado por Zn^{+2} , elevan el pH intracelular (de 6.0 a 7.5), relevante para que se puedan activar canales iónicos (Ca^{+2} , Cl^- y K^+) favoreciendo la hiperactivación. Al mismo tiempo, el aumento en los niveles de AMPc activa a la PKA, estimulando la TK (Proteína Tirosina Cinasa), y éstas a su vez la fosforilación de tirosinas, proceso que se asocia con la capacitación espermática (Darszon *et al.*, 2011).

3. Glutati3n

Las enzimas antioxidantes super3xido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutati3n peroxidasa (GPX) son las encargadas de proteger al espermatozoide contra el estr3s oxidante. Particularmente la GPX es responsable de metabolizar el per3xido de hidr3geno (H_2O_2) producido de manera end3gena, usando como sustrato al glutati3n reducido (GSH), que es oxidado a glutati3n disulfuro (GSSG) y puede volver a su estado reducido por acci3n de la enzima glutati3n reductasa (GR) para que nuevamente tenga actividad antioxidante, proceso conocido como ciclo redox del glutati3n (Mart3nez-S3mano, 2011).

Ahora bien, desde el punto de vista qu3mico, el GSH es un compuesto de masa molecular baja, con un grupo sulfhidrilo (-SH), conformado por los amino3cidos 3cido glut3mico, glicina y ciste3na (Glu-Gly-Cys) (fig. 3), tambi3n llamado L- γ -glutamil-cisteinil-glicina; su f3rmula molecular es $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ y su peso molecular es 307.33 g/mol. El glutati3n oxidado es el L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina disulfuro (GSSG) y su f3rmula molecular es $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ (Sarrasague *et al.*, 2006).

La concentraci3n de glutati3n intracelular se encuentra en el intervalo de 1 a 11 mM en c3lulas som3ticas de mam3feros (Garc3a-Gim3nez *et al.*, 2013; Lu, 2013); estudios m3s especializados han reportado una concentraci3n de GSH en espermatozoides de cerdo, de 3.84 ± 0.21 nM/ 10^8 , y en espermatozoides de humano, 4.47 ± 0.46 nM/ 10^8 (Gadea *et al.*, 2004; Gadea *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha informado que la concentraci3n citos3lica de GSH en c3lulas som3ticas de mam3feros representa entre 70 y 85%, mientras que la concentraci3n nuclear y mitocondrial representan entre el 15 y 30% restante, adem3s se ha reportado un peque3o porcentaje en ret3culo endopl3smico (Garc3a-Gim3nez *et al.*, 2013; Lu, 2013). El GSH tambi3n tiene funciones importantes en la destoxificaci3n de xenobi3ticos y sirve para almacenar y transportar ciste3na (Mart3nez-S3mano, 2011). Por otro lado, es esencial para la proliferaci3n celular y ostenta un papel relevante en la inhibici3n de la apoptosis, ya que su disminuci3n permite la

activación de caspasas y la progresión de la apoptosis. Otra de sus funciones es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que conserva en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de varias cascadas de señalización intracelular; un ejemplo de esto es la de las PKC y PKA (Martínez-Sámano, 2011).

El GSH se sintetiza en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas: γ -glutamyl-cisteína (γ -GluCys) y sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés), que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido γ -glutamylcisteína. Esta enzima es considerada como el paso limitante en la síntesis de glutatión; posteriormente la glicina, en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa, forma GSH. El ATP es donador de energía para ambas reacciones. La concentración intracelular de GSH es regulada por la inhibición de la GCL por el producto final, GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo (fig. 4) (Sarrasague *et al.*, 2006; Martínez-Sámano, 2011; Lu, 2013).

3.1 Metabolismo del glutatión

Durante la destoxificación de las ERO, el GSH está involucrado en dos tipos de reacciones: la interacción no enzimática con radicales como el $O_2^{\cdot-}$, óxido nítrico y $OH^{\cdot}$; otra reacción en la que participa es proporcionando un electrón para reducir peróxidos en la reacción catalizada por la GPx (Fernández-Checa, 2008). El producto final de la oxidación del GSH es el GSSG, regenerado por la GR, que transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciéndose a $NADP^+$. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no es degradado, sino reciclado, y así puede reutilizarse (Martínez-Sámano, 2011; Ralf *et al.*, 2000).

Por otro lado, durante la generación de conjugados S-glutatión por las glutatión S-transferasas (GST) o por la salida de GSH de las células, el nivel interno de GSH disminuye, de ahí que tenga que ser reemplazado

por síntesis *de novo* (Dringen *et al.*, 2000). Entonces, el GSH extracelular y los conjugados S-glutación son sustratos para la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT), la cual cataliza la transferencia del γ -glutamilo del GSH (o de los conjugados S-glutación) a una molécula aceptora y, por ende, genera el dipéptido cisteinilglicina (o el conjugado S-cisteinilglicina) y el γ -glutamilo conjugado. El dipéptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas de cisteína y glicina, aminoácidos que posteriormente pueden ser transportados por la célula a través de transportadores específicos y participar en la síntesis *de novo* de GSH (Ralf *et al.*, 2000).

Ahora bien, cuando las células espermáticas son liberadas del testículo, su núcleo está sumamente empaquetado para realizar actividad transcripcional; no obstante, presentan cambios durante su paso por el epidídimo (maduración espermática epididimaria), por el tracto reproductor femenino (capacitación) y en el momento previo a la fertilización (reacción del acrosoma) (Halliwell, 2006). Es posible lograr estos cambios por modificaciones en las proteínas existentes que, a su vez, podrían ser moduladas por señales originadas desde los diferentes ambientes espermáticos; de esta manera, la fisiología de los espermatozoides dependerá de redes de señales intra y extracelulares complejas (Halliwell, 2006).

Una de las señales extracelulares que más se conoce es la participación de citocinas, hormonas y neurotransmisores que se unen a receptores específicos de la superficie celular, mismas que al juntarse con sus receptores pueden generar varios tipos de señales intracelulares, como cambios en la concentración de iones, activación de proteínas G, como GMPc, y activación de cinasas PKA y PKC. Estas modificaciones, a su vez, provocarán la liberación de segundos mensajeros: AMPc, Ca^{2+} y metabolitos de fosfolípidos y la fosforilación de proteínas, procesos que resultan esenciales para las funciones celulares, en el caso del espermatozoide para adquirir su capacidad fertilizante (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014; Darszon *et al.*, 2011).

Ya que las ERO intervienen en el desempeño espermático durante su tránsito desde el testículo hasta el ovocito y son producidas por los

mismos espermatozoides, los antioxidantes –entre los que se encuentra GSH/GPX– pueden retrasar o inhibir la oxidación, por lo tanto, pudieran funcionar como reguladores de la capacitación (Rodwell, 2007).

Se ha observado que las ERO participan en la fosforilación de tirosinas, influyendo directamente en los niveles intracelulares del AMPc, gracias a la estimulación de la adenilato ciclasa (ACs) y por consecuencia, la fosforilación de proteínas (Rivlin *et al.*, 2004). Además de que el H_2O_2 puede aumentar la fosforilación de tirosina a través de la inhibición de la actividad de la TP (Hecht y Zick, 1992).

4. Aplicaciones prácticas del GSH

El GSH se ha usado comúnmente para mejorar la calidad espermática de varias especies, sobre todo en espermatozoides congelados, usando concentraciones variables del mismo (Gadea *et al.*, 2005). Sin embargo, el impacto positivo de las ERO se ha determinado agregando moléculas que contrarresten su producción o su efecto, como algunos antioxidantes (Gadea *et al.*, 2005). Un ejemplo de lo anterior es lo reportado por Gadea y colaboradores en 2005, quienes encontraron que el GSH puede propiciar un resultado contraproducente en la capacitación espermática cuando se agrega en una concentración de 5mM sobre los espermatozoides de cerdo, ya que disminuyen los espermatozoides viables capacitados respecto del control, y a 1mM; en contraste, se incrementan los espermatozoides que penetran al ovocito, a 1mM de GSH la movilidad es mejor que a 5 y 10mM (Gadea *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016). Por otro lado, en humanos y en cerdos la concentración basal de GSH disminuye en espermatozoides congelados respecto de espermatozoides frescos (Gadea *et al.*, 2004; Gadea *et al.*, 2011).

Estudios recientes han demostrado que no sólo el espermatozoide de cerdo sufre daño al congelar-descongelarlo; Lucio *et al.* (2016) reportaron en espermatozoides descongelados de perro, mediante el estudio CASA (por sus siglas en inglés, Computer Assisted Sperm Analysis), una

reducción en la movilidad progresiva total y en la actividad mitocondrial de espermatozoides tratados con 20 mM de GSH, comparándolos con el control sin GSH (Lucio *et al.*, 2016).

Acerca de lo anterior, es evidente que la concentración de GSH resulta fundamental para mantener un equilibrio redox en el espermatozoide, no únicamente en especies domésticas como el cerdo o el perro; en 2017, Angrimani y colaboradores reportaron en espermatozoides de *Leopardus tigrinus* una disminución en la actividad mitocondrial dependiente de la concentración de GSH, fenómeno que pudiera ser resultado de la inhibición de las ERO por las altas concentraciones de este antioxidante, bloqueando así la actividad fisiológica que tienen las ERO en el espermatozoide (Angrimani *et al.*, 2017).

Una muestra de la versatilidad del GSH es su uso en diferentes técnicas, no únicamente para espermatozoides congelados-descongelados o evaluación de su actividad en procesos como capacitación espermática, lo que fue demostrado por Zambrano *et al.* (2017), quienes dijeron haber utilizado GSH a concentración de 15 mmol/L en combinación con medios de pretratamiento para ICSI (por sus siglas en inglés, Intracytoplasmic Sperm Injection), encontrando una mejora en la descondensación de la cromatina del espermatozoide de toro, en comparación con tratamientos sin GSH (Zambrano *et al.*, 2017).

El sistema antioxidante enzimático y no enzimático del espermatozoide es muy importante para su maduración, primero en el testículo, después en el epidídimo y por último en el tracto reproductor de la hembra; por lo tanto, el GSH participa en la regulación de estos procesos, aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente descrito.

5. Conclusiones

El proceso de capacitación espermática resulta fundamental para que el espermatozoide cumpla con su función principal: la de fertilizar al óvulo; sin embargo, dicho proceso está regulado por varios factores, entre los que destacan la participación de las ERO. La oxidación que sufre el

espermatozoide debe estar controlada para que no sea contraproducente en su fisiología; tal regulación está dada, entre otras variables, por el GSH, ya que en conjunto con el sistema antioxidante enzimático proporciona el ambiente redox adecuado para que el espermatozoide adquiera su capacidad fertilizante.

Figura 1. Esquema del ciclo REDOX en la regulación de las ERO (Aitken y Roman, 2008)

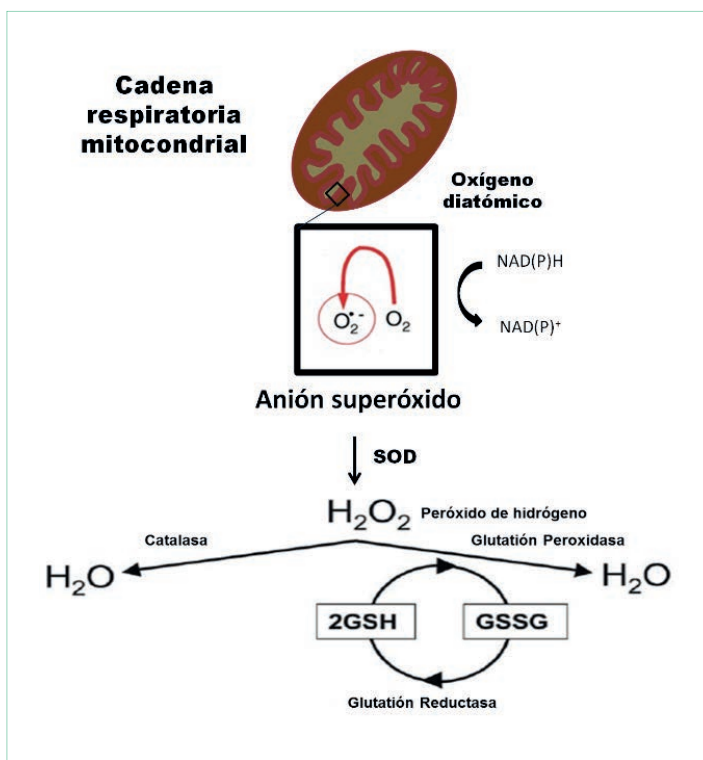


Figura 2. **A)** Después de la eyaculación, una población heterogénea de espermatozoides alcanza el tracto reproductivo femenino. **B)** Sólo unos cuantos logran llegar al oviducto. **C)** Sólo el espermatozoide capacitado correctamente puede fertilizar al ovocito. Espermatozoide muerto (gris), dañado (rojo), normal (azul), hiperactivado (verde-azul) y capacitado (verde) (López Úbeda y Matas Parra, 2015).

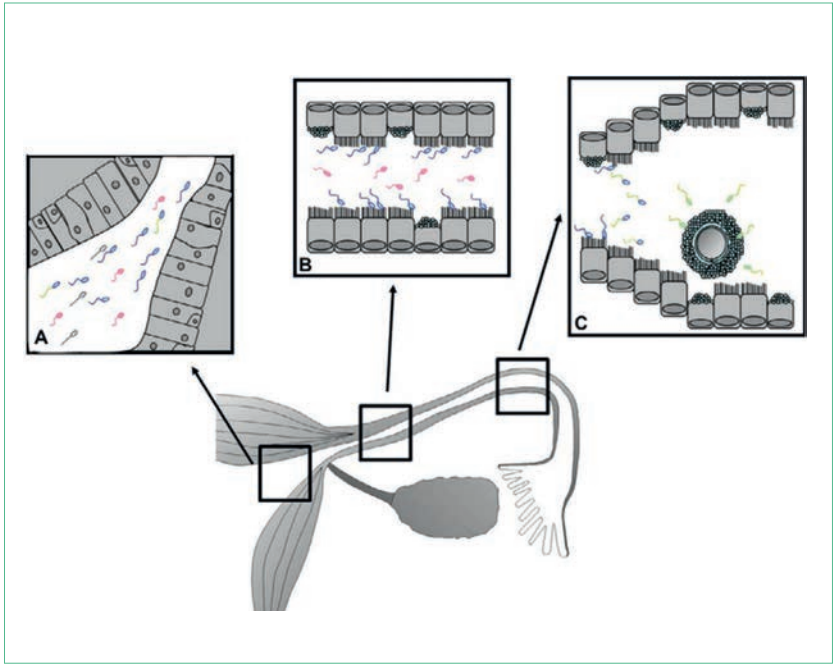


Figura 3. Representación del **A)** glutatión reducido (GSH) y **B)** glutatión disulfuro (oxidado, GSSG) (Martínez-Sámamo, 2011).

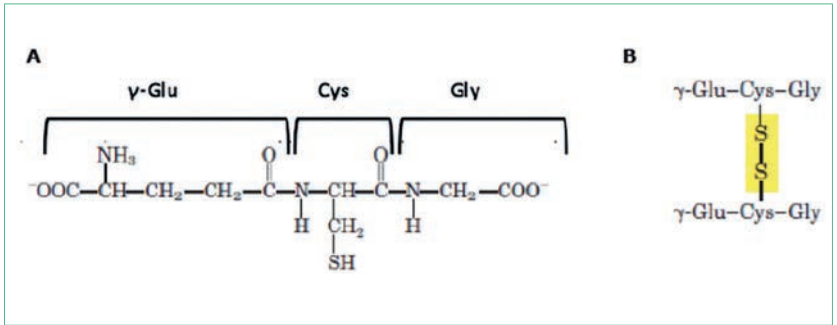
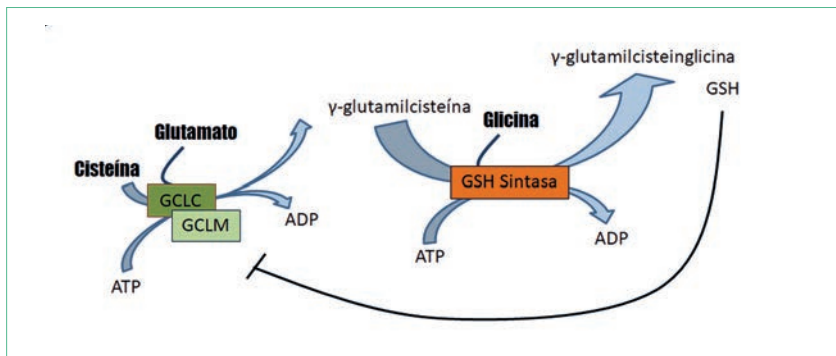


Figura 4. Esquema representativo de la síntesis de glutatión (modificado de Martínez-Sámano, 2011; Lu, 2013).



Referencias

- Aitken, R.J., Buckingham, D. y Harkiss, D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 97, 441-450.
- Aitken, R.J. y Roman, S.D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1, 15-24.
- Aitken, R.J., Gibb, Z., Baker, M.A., Drevet, J. y Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 28, 1-10.
- Angrimani, D.S., Barros, P.M., Losano, J.D., Cortada, C.N., Bertolla, R.P., Guimaraes, M.A., Correa, S.H., Barnabe, V. H. y Nichi, M. (2017). Effect of different semen extenders for the storage of chilled sperm in Tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 89, 146-154.
- Cervantes, M.I., Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A., López-Wilchis, R., Ambriz, D. y Rosado, A. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med*, 54, 196-204.
- Cisneros-Mejorado, A., Hernández-Soberanis, L., Islas-Carbajal, M. C. y Sánchez, D. (2014). Capacitation and Ca²⁺ influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology*, 2, 145-154.
- Cross, N.L. (2004). Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod*, 71, 1367-1373.

- Cunningham, J. G. y Klein, B. G. (2003). *Fisiología Veterinaria*. Madrid: Elsevier.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltrán, C. y Trevino, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, 91, 1305-1355.
- De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1998). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 803-817.
- De Lamirande, E. y Gagnon, C. (2003). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1271-1285.
- Dringen, R., Gutterer, J.M. y Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4912-4916.
- Evans, T. C. (1947). Effects of Hydrogen Peroxide Produced in the Medium by Radiation on Spermatozoa of *Arbacia punctulata*. *Biological Bulletin*, 92, 99-109.
- Fernández Checa, J.C. y García-Ruiz, C. (2008). Glutación. En M.K. Fainstein (ed.), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas* (pp. 253-268). México: Manual Moderno ed.
- Ford, W.C. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 10, 387-399.
- Franca, L.R. y Cardoso, F.M. (1998). Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell*, 30, 573-582.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C. y Romar, R. (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl*, 26, 749-756.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., García-Vázquez, F.A. y Gardon, J.C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62, 40-46.
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R. y Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62, 690-701.
- Gadella, B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod Sci.* 107(3-4), 229-236.
- Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A. y Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Development Biol.*, 52(5-6), 473-480.
- Gagnon, C. y De Lamirande, E.D. (2006). Controls of sperm motility. En Christopher J. De Jonge y C. L. R. Barratt (eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* (pp. 108-125). Cambridge University Press ed.

- García-Giménez, J. L., Markovic, J., Dasi, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C. H. y Pallardó, F. V. (2013). Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3304-3316.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634-1658.
- Hecht, D. y Zick, Y. 1992. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H_2O_2 and vanadate In vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188, 773-779.
- Inaba-K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool Sci.* 20(9), 1043-1056.
- Jones, R., Mann, T. y Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*, 31, 531-537.
- Liu, Y. y O'Flaherty, C. (2017). In vivo oxidative stress alters thiol redox status of peroxiredoxin 1 and 6 and impairs rat sperm quality. *Asian J Androl*, 19, 73-79.
- López Úbeda, R. y Matas Parra, C. (2015). An approach to the factors related to sperm capacitation process. *Andrology-Open Access*, 4(1), 9 pp.
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143-3153.
- Lucio, C.F., Silva, L.C., Regazzi, F.M., Angrimani, D.S., Nichi, M., Assumpcao, M.E. y Vannucchi, C.I. (2016). Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. *Cryobiology*, 72, 135-140.
- Macleod, J. (1943). The rôle of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 138(3), 512-518.
- Malo, C., Gil, L., González, N., Martínez, F., Cano, R., De Blas, I. y Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61, 142-147.
- Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P.V. y Juárez-Oropeza, M.A. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de educación Bioquímica*, 30(2), 56-67.
- Medeiros, M.H.G. (2008). Daño al DNA. En M.K. Fainstein (ed.), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas* (pp. 119-134). México: Manual Moderno ed.
- Morielli, T. y O'flaherty, C. (2015). Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149, 113-123.
- O'Flaherty, C. (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 17, 583-590.
- O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G. y Mclachlan, R.I. (2006). Endocrine Regulation of Spermatogenesis. En J.D. Neill (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 1017-1070). USA: Elsevier ed.

- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N. y Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 70, 518-522.
- Roca, J., Rodríguez, M. J., Gil, M. A., Carvajal, G., García, E. M., Cuello, C., Vázquez, J.M. y Martínez, E.A. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology*, 26, 15-24.
- Rodwell, V. W. (2007). Oxidación Biológica. En *Harper. Bioquímica Ilustrada* (pp. 98-102). 17a ed.
- Rosado-A. (1988). Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitacion y la reaccion acrosomal. *Arch Invest Med.*, 19(3), 253-264.
- Sarrasague, M. M., Barrado, D. A., Zubillaga, M., Hager, A., Paoli, T. D. y Boccio, J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40(1), 45-51.
- Shalender Bhasin, G. S. B. (2006). Male Sexual Function. En J.D. Neill (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 1173-1194). Amsterdam: Elsevier.
- Stephans, A. (2010). Moléculas y biometría de masas. En T. Kurt y C. Sugrue (eds.), *Biomicrología* (pp. 89-120). Chicago: University of Chicago Press.
- Tosic, J. y Walton, A. (1946). Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect of respiration. *Nature*, 158, 485.
- Tulsiani-DRP. (2006). Glycan-Modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol y Cell Endocr.*, 250, 58.
- Vadnais, M. L. y Althouse, G. C. (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, 76, 1508-1516.
- Zambrano, F., Águila, L., Arias, M.E., Sánchez, R. y Felmer, R. (2017). Effect of sperm pretreatment with glutathione and membrane destabilizing agents lysolecithin and Triton X-100, on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Domest Anim.*, 52(2), 305-311.
- Zhang, X. G., Liu, Q., Wang, L. Q., Yang, G. S. y Hu, J. H. (2016). Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. *Anim Sci J.*, 87(10), 1195-1201.

FITOESTRÓGENOS: UN EJEMPLO DE PERTURBADOR ENDOCRINO

Ma. del Rosario Tarragó Castellanos y
Edith Arenas Ríos¹

¹ Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica del Espermatozoide, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

1. Introducción

El sistema endocrino es el encargado de regular el funcionamiento de un organismo para que mantenga su homeostasis. En este sistema, las hormonas son las responsables de transmitir la información entre los órganos involucrados; además de ser esenciales en funciones como las reproductoras, están involucradas en el desarrollo normal de los organismos y en el desempeño y diferenciación cerebral.

Las hormonas van a coordinar el desarrollo de cada individuo a partir de una sola célula fertilizada y ayudan a que ese organismo en desarrollo vaya cubriendo las necesidades de cada uno de sus órganos a través de las diversas etapas de su existencia. Las hormonas son cruciales en la vida de un individuo, por lo que una deficiencia o falla en el sistema endocrino puede conducir a un estado de enfermedad o incluso a la muerte. Es por esto que cualquier sustancia o compuesto que pueda modificar el funcionamiento endocrino pone en riesgo la homeostasis y la sobrevivencia; de manera general, a este tipo de compuestos los llamaremos perturbadores endocrinos (ED) (Craveadi *et al.*, 2007).

Kavlock *et al.* (1996) definieron los perturbadores como sustancias extrañas al organismo que producen efectos deletéreos sobre el mismo o su descendencia, como consecuencia de una alteración endocrina; es decir, un agente exógeno que interfiere en la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión a un receptor o modifica la acción o eliminación de ligandos naturales responsables de mantener la homeostasis, la regulación y desarrollo del organismo.

El ejemplo más claro de un perturbador es el dietilestilbestrol (DES), sustancia química que se comporta como hormona y afecta no solamente la salud de la persona que lo consume, ya que también puede llegar a generar un daño irreversible en sus descendientes, debido a que la exposición de la madre durante la gestación a estos compuestos puede acarrear efectos variados e inesperados en su estirpe varias décadas después, uno de ellos puede ser presentar algún tipo de cáncer o infertilidad (Toppari *et al.*, 1996).

Basándose en estudios epidemiológicos y en animales de laboratorio, se tiene la hipótesis de que los ED afectan la reproducción, la función tiroidea y la diferenciación cerebral. Algunos de los daños que se han relacionado con los ED en niñas son cáncer de mama, endometriosis y pubertad precoz (Craveadi *et al.*, 2007); en el varón se ve alterada la salud reproductiva, presentan disminución de la calidad espermática, cáncer testicular y anomalías del tracto reproductor (Jégou *et al.*, 1999).

2. Clasificación de perturbadores endocrinos

Podemos clasificar los ED en dos grandes grupos: 1. Xenoestrógenos, que corresponden a compuestos químicos elaborados por el hombre, y 2. Compuestos de origen natural como los fitoestrógenos y los estrogénicos localizados en hongos. Algunos ejemplos de estos compuestos son:

- Contaminantes farmacéuticos y de uso veterinario: ej. dietilestilbestrol, promotores de crecimiento.
- Contaminantes de la industria química: ej. bisfenol A, ftalatos, metales pesados.
- Productos fitosanitarios: ej. herbicidas, fungicidas, insecticidas, etcétera.
- Sustancias naturales, fitoestrógenos: genisteína, daidzeína, coumestrol, zeralonona, etcétera (Cravedi *et al.*, 2006).

3. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos químicos que se encuentran de manera natural en las plantas, en las que actúan como fungicidas (Sukumuran y Gnanamanickam, 1980) y que regulan diversas funciones requeridas para el mantenimiento fisiológico de las mismas (Feet y Osman, 1982). Algunos factores que pueden generar “estrés” en las plantas, como la radiación ultravioleta, el corte o la deficiencia de nutrientes, estimulan los niveles de fitoestrógenos en ellas (Hanson *et al.*, 1965; Rossiter y Bech, 1966; Rossiter y Bech 1966a; Medina *et al.*, 1982; Medina *et al.*, 1982a). Al ser ingeridos, estos compuestos interactúan con los receptores a estrógenos induciendo un efecto estrogénico/antiestrogénico (Livingston *et al.*, 1961; Loper y Hanson 1964; LeBars *et al.*, 1990).

Las primeras evidencias de que los fitoestrógenos pueden alterar la reproducción en mamíferos data de 1946 en Australia, borregos alimentados con trébol rojo presentaron diversas perturbaciones reproductivas, infertilidad y galactorrea en machos; todas estos trastornos manifestaban un efecto estrogénico y se le conoció como “enfermedad del trébol” (Bennets *et al.*, 1940). Posteriormente se reportaron afectaciones similares en bovinos estabulados que también fueron alimentados con trébol rojo (Kalla *et al.*, 1984), por lo que se consideró a estos compuestos como inductores de infertilidad en ambas especies (Hughes, 1988).

Romero *et al.* (1997) describieron un síndrome estrogénico en vacas lecheras, las cuales podían presentar celos repetidos, abortos, quistes ováricos, falsos estros, útero turgente en animales con 40-60 días de preñez, afecciones que se presentaron como consecuencia del consumo de alfalfa con grandes cantidades de coumestrol, inducidas por la contaminación de la alfalfa con el hongo *Pseudopesisa medicaginis*, que incrementa hasta 75 veces los niveles basales de coumestrol.

En otras especies como los *Cheetas*, la disminución de la fertilidad se ha relacionado con ingerir una dieta a base de soya (Setchell *et al.*, 1987) o, por ejemplo, en mujeres debido a dietas ricas en soya (Amsterdam *et al.*,

2005; Chandrareddy *et al.*, 2008). Roedores cuya alimentación contenía fitoestrógenos presentaron alteraciones en la actividad uterotrópica y reducción de la fertilidad (Thigpen *et al.*, 1999).

En los países orientales se consume una serie de alimentos derivados de la soja que, en promedio, equivalen a 1.5 mg/kg/día de isoflavonas, en comparación con las poblaciones occidentales que consumen 0.2 mg/kg/día (Coward *et al.*, 1993). En las sociedades orientales se registra una menor incidencia de algunos tipos de cáncer (mama, próstata, recto y estómago) y las mujeres pre y postmenopáusicas presentan pocas alteraciones relacionadas con los cambios hormonales (por ej. bochornos, osteoporosis, angina de pecho). Diversos estudios han relacionado el consumo de isoflavonas con una serie de efectos benéficos en la salud, al actuar como anticancerígenos o antioxidantes, aportando grandes beneficios como agonistas de estrógenos en el sistema cardiovascular y óseo (Song *et al.*, 2007). En paralelo, se sugiere un número de efectos negativos en el desarrollo embrionario e interfiere en la diferenciación sexual normal (Bar-El y Reifen, 2010; Wuttke *et al.*, 2007).

Otros fitoestrógenos, como el coumestrol, son consumidos principalmente en la leche, en complementos alimenticios a base de alfalfa, brotes de frijol, germinado de alfalfa y leguminosas. En el caso de los recién nacidos, se considera que la principal ingesta de coumestrol ocurre vía la leche materna durante el periodo de lactancia (Moon *et al.*, 2009).

4. Estructura, clasificación y mecanismos de acción de los fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos con una estructura similar al estradiol, capaces de mimetizar o modular la acción de los estrógenos endógenos al unirse al receptor de estrógeno; presentan una actividad estrogénica *in vitro* que llega a ser superior a algunas moléculas sintéticas (Kuiper *et al.*, 1998). Estos compuestos se encuentran en las plantas y son sintetizados a partir de fenoles simples o fenilpropanoides (Rolfe, 1998).

En la actualidad se han encontrado más de 200 sustancias de origen vegetal que presentan actividad estrogénica. La mayoría de los fitoestrógenos pertenecen al grupo de los flavonoides, los cuales se dividen en cinco subgrupos (Moutsatsou, 2007) (fig. 1):

- Isoflavonas, presentes en leguminosas: ej. granos de soya, lentejas, chícharo. Los principales compuestos son genisteína, daizeína, biochanina A y formononetina.
- Lignanós, se encuentran en diversos cereales: semilla de lino, salvado, centeno, trigo sarraceno, mijo, soja, avena y cebada, así como en las frutas, algunas verduras y bayas. Los principales compuestos son el enterodiol y la enterolactona.
- Coumestanos, localizados sobre todo en la alfalfa. El principal compuesto es el coumestrol.
- Flavonas, se encuentran en el apio, tomillo, diente de león, flor de trébol, manzanilla, pimiento verde. El principal compuesto es el luteolin.
- Estilbenos, se encuentran en las uvas, arándanos, frambuesas y moras. El principal compuesto es el resveratrol.

Tanto los estrógenos como los fitoestrógenos poseen un anillo fenólico y la distancia entre ambos hidroxilos en los dos grupos es similar (Bojase *et al.*, 2001; Shirataki *et al.*, 1999) (fig. 2). A pesar de esta similitud, los fitoestrógenos tienen la capacidad de actuar como agonistas y antagonistas, estos compuestos se unen clásicamente a los receptores de estrógenos y producen una respuesta típica estrogénica cuando son administrados o consumidos en animales o humanos (Shutt y Cox, 1972). Los fitoestrógenos son más estables que los estrógenos naturales, tienen una vida mayor debido a que no son tan rápidamente metabolizados como las hormonas endógenas (Moutsatsou, 2007).

El potencial efecto antagonista de los fitoestrógenos puede explicarse en parte por la identificación de dos tipos de receptores: α y β . Estos compuestos

tienen mayor afinidad por los segundos, los cuales se expresan en diferentes tejidos en los que generan efectos específicos (Cassidy y Faughnan, 2000) (tabla 1). A nivel celular, el resultado que induzcan depende de diversos factores, como la concentración del compuesto, el estatus de los receptores, la presencia o ausencia de estrógenos endógenos, así como el órgano blanco.

Otros mecanismos de acción propuestos para los fitoestrógenos se relacionan con un efecto antiangiogénico, antioxidante y antiproliferativo (Setchell y Cassidy, 1999). Los efectos intracelulares de los fitoestrógenos no se limitan a los genómicos clásicos en los receptores de estrógenos α y β , también pueden inhibir enzimas involucradas en la esteroidogénesis (3β y 17β hidroxisteroide deshidrogenasa, aromatasa), inhibir la tirosina cinasa, modificar respuestas biológicas al actuar en el citocromo P450, regulando la expresión de algunos genes o de factores de crecimiento y estimular síntesis de proteínas que une hormonas sexuales (Brown y Setchell, 2001; Duza *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2005; Magee y Rowland, 2004; Whitten y Patisaul, 2001).

Específicamente, la síntesis de proteínas que une hormonas sexuales sucede a nivel hepático, los fitoestrógenos –al igual que los estrógenos– son capaces de inducir la síntesis de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). Sin embargo, los fitoestrógenos tienen una baja afinidad de unión a la SHBG comparados con el estradiol, provocan un efecto antiestrogénico al disminuir los niveles de hormona endógena libre (Nagel *et al.*, 1998).

La potencia relativa de los fitoestrógenos depende de:

- Tratamiento agudo o crónico
- Etapa: prenatal, neonatal, juvenil, adulto
- Dosis
- Ruta de administración: oral, subcutánea, dieta
- Factores animales: especie, edad, sexo
- Respuesta monitoreada: ej. peso uterino, edad de apertura vaginal, peso corporal, fertilidad, etcétera.

5. Metabolismo de los fitoestrógenos

La mayoría de los fitoestrógenos son consumidos como precursores glicosilados, por lo que requieren ser metabolizados a compuestos activos por medio de la escisión de glucosa (Setchell, 2000) (fig. 3). Una vez ingeridos, son metabolizados en el intestino gracias a la flora ahí presente y en algunos casos se llegan a producir compuestos con mayor actividad biológica, como la transformación de daidzeína a equol.

Durante un tiempo se llegó a considerar que los fitoestrógenos no implicaban ningún riesgo en neonatos, al verse limitado el metabolismo de estos compuestos, ya que no se podría llevar a cabo la escisión de la glucosa, no obstante, se encontró un proceso alternativo que se realiza en el yeyuno y que convierte los flavonoides glicosilados a compuestos activos por medio de uridina 5 difosfato glucuronil transferasa (Spencer *et al.*, 1999).

6. Efecto de los fitoestrógenos en las etapas embrionaria y neonatal

En los últimos 50 años se ha reportado una elevada incidencia de alteraciones reproductivas en hombres, tales como fallas en el descenso testicular (criptorquidia), hipospadias, aumento de la incidencia de cáncer en testículos y baja calidad del semen, a este conjunto de alteraciones se le conoce como “Síndrome de disgenesia testicular” (Skakkepack *et al.*, 2001). Este incremento de perturbaciones reproductivas observadas tanto en humanos como en animales sugiere la exposición a factores ambientales y a un estilo de vida que favorece el contacto con perturbadores endocrinos, entre los cuales se les ha dado menor atención a los de origen natural, llamados fitoestrógenos, cuya presencia se considera que es cada vez mayor (Cederrot *et al.*, 2009).

Los órganos y sistemas de cualquier individuo son más sensibles en las etapas de desarrollo que en la vida adulta. La morfogénesis y diferenciación extensa de tejidos y órganos importantes para la

reproducción ocurren en periodos pre y postnatales, muchos de estos eventos dependen de la señalización de las hormonas esteroides (Young *et al.*, 1964; Ma, 2009; Sakuma, 2009).

Los perturbadores endocrinos, incluyendo los fitoestrógenos, pueden tener un impacto significativo en el desarrollo y alterar posteriormente la reproducción, efectos que se llegan a manifestar a largo plazo, es decir, hasta la etapa adulta (Jefferson *et al.*, 2012). En humanos se han encontrado valores de fitoestrógenos en el líquido amniótico en el segundo trimestre de gestación similares a los reportados en adultos; es importante recordar que la afinidad de los fitoestrógenos a la SHBG es despreciable, por lo que la exposición del feto se correlaciona con los niveles maternos de estos compuestos (Milligan *et al.*, 1998).

La exposición en la etapa neonatal a este tipo de compuestos sucede por medio de la lactancia; los niveles de fitoestrógenos van a depender de la dieta, ya que se reportan variaciones de 14.3 nM/L hasta 378nM/L. Durante la lactancia, los bebés intolerantes a la lactosa que son alimentados con suplementos de leche de soya pueden alcanzar niveles circulantes de isoflavonas en un rango de 552 µg/L a 1775 µg/L (Setchell *et al.*, 1997); en esta etapa los valores endógenos de estradiol son de 40-80 pg/mL, por lo que los niveles de isoflavonas son de 13,000 a 22,000 veces más altas que los niveles endógenos de estradiol (Zung *et al.*, 2001).

Los estudios realizados en humanos relativos a la exposición neonatal por consumo de leche de soya son controversiales, ya que algunos sugieren que no hay ninguna relación entre los fitoestrógenos ingeridos y las alteraciones reproductivas observadas en la pubertad y la etapa adulta (Brian *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios reportan, en el caso de niñas, la prevalencia de inflamación de mama durante los dos primeros años de vida (Zung *et al.*, 2008), estrogenización del epitelio vaginal (Bernbralum *et al.*, 2008) e incremento en el riesgo de presentar tumores uterinos (D'Alosio *et al.*, 2001) y en el hombre, la presencia de hipospadias (North and Golding, 2008), así como infertilidad, padecimientos relacionados con los efectos estrogénicos de estos compuestos.

Dada la dificultad que se presenta para realizar análisis en humanos o en algunas especies animales, se ha utilizado a los roedores como modelos para investigar el efecto de estos compuestos. De manera muy general se ha reportado que la administración prenatal de genisteína en ratas reduce el peso al nacimiento, así como la distancia anogenital; en cuanto al cerebro, eleva el volumen de los núcleos sexualmente dimórficos en el área preóptica hipotalámica y específicamente en hembras provoca un adelanto de la pubertad, así como alteraciones de los ciclos vaginales (Levy *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 2003); en machos también modifica la distancia anogenital y provoca una reducción del tamaño testicular, en la etapa adulta pueden presentar bajos niveles de testosterona y escasa conducta copulatoria (Wisniewski *et al.*, 2003).

Nosotros hemos observado que una dosis única de coumestrol en el día 10 de gestación en dosis equimolares a 2 y 4 μg de estradiol y analizado en el día 18, produce en el ovario un retraso en el desarrollo, al advertirse escasos folículos. En el caso de los machos, los cordones germinales se observan menos definidos y con un aspecto fibrilar, una disminución en las células de Sertoli y germinales. Nuestros resultados sugieren consecuencias opuestas, ya que se registra un efecto estrogénico del coumestrol en machos y antiestrogénico en hembras (Montes de Oca, 1996; Bedolla, 1996).

La etapa perinatal es muy importante, toda vez que las diferencias en la actividad reproductiva entre machos y hembras se llevan a cabo durante este periodo, por la aromatización de andrógenos (Arai, 20001). El tratamiento con isoflavonas en esta fase puede causar masculinización de los núcleos sexualmente dimórficos en el área preóptica y a su vez suprimir la respuesta de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis a la estimulación de GnRH (Faber y Hughes, 1991; Faber y Hughes, 1993).

Se ha demostrado que la genisteína consumida por la madre durante la gestación no sólo atraviesa la placenta, sino también la barrera hematoencefálica del cerebro fetal (Doerge *et al.*, 2001), en el área preóptica se encuentran los $\text{Er}\beta$, involucrados en la regulación de neuronas

sexualmente dimórficas que responden a estradiol (Tempte *et al.*, 2001). Consecuentemente, la genisteína puede inducir la diferenciación de un cerebro masculino en la hembra, o hembras expuestas neonatalmente a coumestrol pueden presentar ciclos anovulatorios en la etapa puberal y adulta (Whiten *et al.*, 1993).

La administración de fitoestrógenos en hembras neonatas causa alteraciones morfofisiológicas en el tracto reproductivo, las cuales se hacen visibles a los 40 días de edad y son irreversibles, entre éstas se observa cornificación vaginal persistente (Burroughs, 1995), ovarios con cuerpos hemorrágicos y escasos folículos ovulatorios (Burroughs *et al.*, 1990), metaplasia escamosa uterina (Forsberg y Kalland, 1981), apertura vaginal temprana (Burroughs, 1995), incremento del peso uterino (Medlock *et al.*, 1995), bajo peso corporal e irregularidad en los ciclos vaginales (Whitten y Naftolin, 1992).

La presencia de ciclos anovulatorios es frecuente debidos tanto a alteraciones ováricas, como por cambios en la respuesta hipofisiaria a GnRH para la liberación de LH, lo cual sugiere una perturbación general del eje hipotálamo hipofisiario que genera irregularidades en la función ovárica (Jefferson y Williams, 2011), presentando un patrón similar al “síndrome de retraso ovulatorio” (Whitten *et al.*, 1993).

Nosotros hemos observado que la administración neonatal de coumestrol durante los primeros cinco días, en dosis de 150 µg, induce estro persistente; las hembras presentan un coeficiente de lordosis de 100%, así como quistes ováricos (Tarragó *et al.*, artículo en proceso).

Los efectos descritos por la administración neonatal en machos son contradictorios y dependen tanto de la dosis como del tiempo de exposición y del fitoestrógeno suministrado. El coumestrol en los primeros cinco días postnatales no modifica los parámetros fisiológicos ni espermáticos en el animal adulto (Awoniyi *et al.*, 1997). Sin embargo, la genisteína durante ese mismo periodo retrasa el proceso de espermatogénesis y promueve un decremento de los niveles de FSH (Atanassova *et al.*, 2000);

cuando la administración se realiza pre y postnatal sí reduce los niveles de testosterona (Klein *et al.*, 2002).

En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, en el que administramos genisteína a ratas Wistar en dosis equivalente a la consumida por bebés en las primeras semanas de nacidos, de los días 1-5 postnatal, en el sexto pudimos percibir modificaciones de tipo estrogénico en los cordones seminíferos. Advertimos un incremento del área del conducto seminífero, disminución del número de células de Sertoli y aumento en el número de células intersticiales (Tarragó *et al.*, en proceso). En la etapa adulta, al valorar la conducta sexual, encontramos un efecto antiestrogénico, ya que el tratamiento indujo un resultado facilitatorio de la conducta al elevar el número de eyaculaciones (Otal *et al.*, 2016). A pesar de lo anterior, la cantidad de hembras gestantes así como el de crías disminuye, lo cual coincide con un efecto estrogénico.

7. Efecto de los fitoestrógenos en adultos

Hemos mencionado que los efectos de la administración o consumo de fitoestrógenos durante las etapas perinatales se pueden manifestar hasta la fase adulta, lo que dificulta determinar en qué etapa se inducen algunas alteraciones; un ejemplo de esta problemática se relaciona con la disminución en el número de espermatozoides que se ha observado en diversas poblaciones. Un estudio reciente realizado en Asia (Iwamoto *et al.*, 2009), donde el consumo de fitoestrógenos es alto en comparación con otras partes del mundo, arrojó que el número promedio de espermatozoides por eyaculado es similar al nivel más bajo reportado en algunos países europeos; sin embargo, no se puede determinar si esto obedece a la dieta, al estilo de vida, a factores genéticos o a una relación de éstos (Giwerzman, 2011).

No obstante, dado que la acción de los fitoestrógenos no se limita a la interacción con los receptores a estrógenos, se ha sugerido que también

puede interferir en el funcionamiento de los receptores a andrógenos y a su vez afectar los últimos pasos de la espermatogénesis (Chavarro *et al.*, 2009). La exposición a altos niveles de fitoestrógenos durante un intervalo largo en la vida adulta o durante etapas críticas del desarrollo podría dañar la fecundidad al entorpecer el proceso de espermatogénesis.

La mayoría de los estudios se ha realizado en etapas embrionarias y neonatales, siendo menos aquellos efectuados en etapa adulta. En un trabajo hecho con ratas macho Wistar, a las cuales se les administró durante tres días diferentes dosis de coumestrol, se encontró que el tratamiento ocasionó una reducción de los niveles hormonales de testosterona sin modificar los de gonadotropinas, sugiriendo un efecto directo en la biosíntesis de esteroides probablemente inhibiendo la enzima 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa. A nivel testicular se observan alteraciones en los túbulos seminíferos, principalmente en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero (fig. 4). Los resultados de este trabajo no siguen un comportamiento monotónico, debido a que el tipo de respuesta que presentan es no monotónico u hormético (Tarragó *et al.*, 2006).

En el caso de las hembras son escasos los estudios que se tienen en esta etapa. En humanos, un caso único se reportó relacionado con un alto consumo de fitoestrógenos (4 onzas de soya por día), lo que provocó un síndrome persistente de excitación sexual caracterizado por dismenorrea y menometrorragia, así como por una elevada tensión pélvica. El efecto de los fitoestrógenos fue reversible y no se presentaron síntomas después de tres meses de cambiar la dieta (Amsterdam *et al.*, 2005).

8. Conclusiones

- Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos que pueden inducir efectos como agonistas o antagonistas del estradiol.
- Las respuestas que provocan son de tipo no monotónicas, por lo que el efecto mayor se puede tener tanto en dosis alta como bajas.

- La ventana de riesgo a la exposición de estos compuestos son las etapas embrionaria y neonatal, en ocasiones el daño se detecta varias décadas después.
- La unión a los receptores de estradiol no es el único mecanismo de acción que tienen los fitoestrógenos.
- El efecto de estos compuestos depende de factores tales como compuesto, dosis, vía y tiempo de administración, etapa en la que se administra y respuesta u órgano analizado.

Tabla 1. Distribución de receptores (ER) α y β en tejidos de humanos (Cassidy y Faughnan, 2000).

Er α	ER α and ER β	ER β
Adrenales	Mama	Cerebro
Riñón	Ovarios	Timo
Testículo	Útero	Vejiga
		Pulmón
		Próstata
		Hueso
		Vasculatura

Figura 1. Representación de los cinco grupos de flavonoides comparados con el 17 β estradiol.

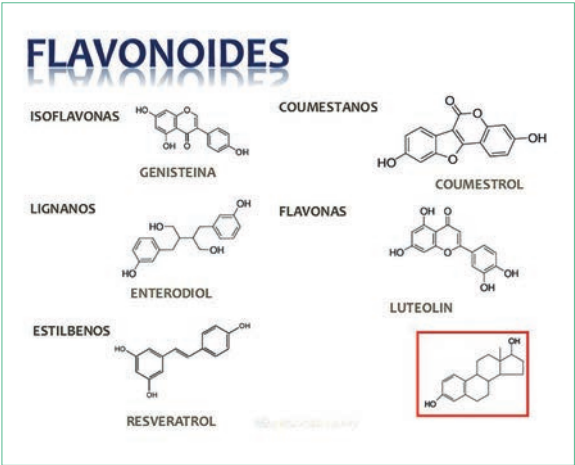


Figura 2. Comparación entre una isoflavona y el 17 β estradiol, ambos poseen un anillo fenólico y la distancia entre los dos hidroxilos es similar.

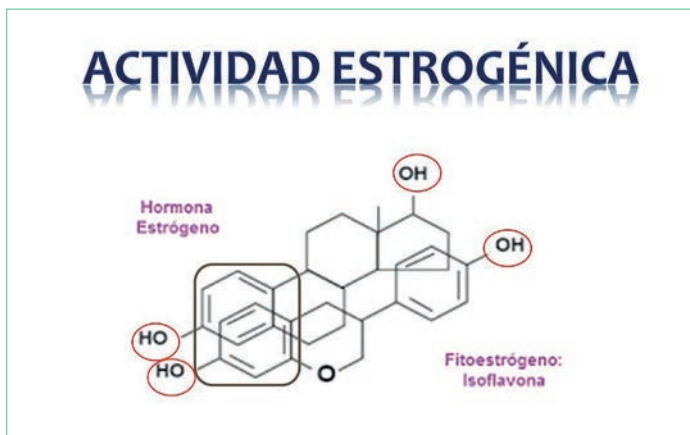


Figura 3. Formación de isoflavonas activas a partir de compuestos glicosilados en los cuales se lleva a cabo la escisión de la glucosa.

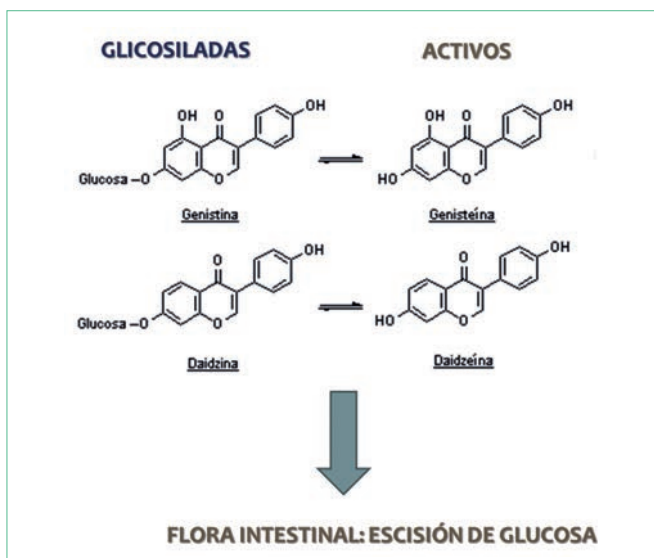
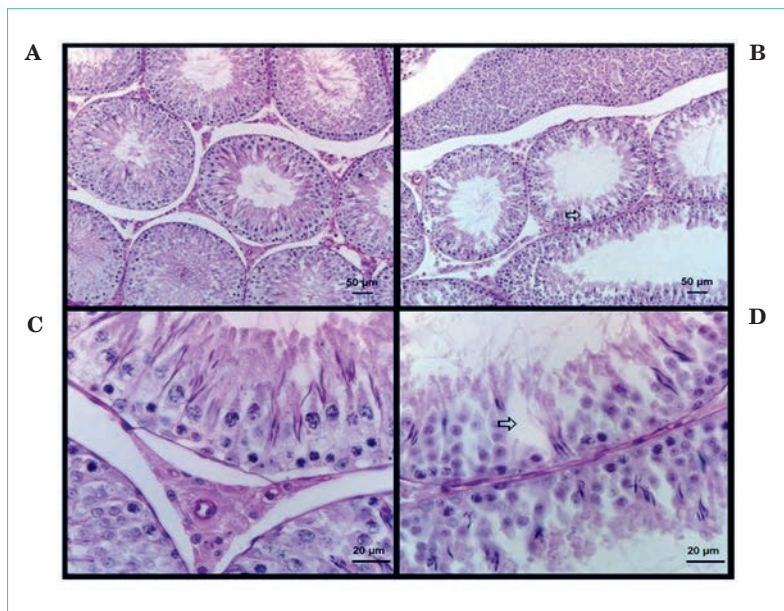


Figura 4. Fotomicrografía de corte transversal de testículo de rata, en la que se observan túbulos seminíferos. **A** y **C**, tratamiento control con aceite; **B** y **D** muestran imágenes de testículo derecho, tratamiento con coumestrol, el cual induce una disminución de la diversidad celular, así como inhibición de algunas fases del epitelio seminífero. Además, se observa un claro incremento del espacio intracelular (modificado de Tarragó *et al.*, 2006).



Referencias

- Amsterdam, A., Abu-Rustum, N., Carter, J. y Krychman, M. (2005). Persistent sexual arousal syndrome associated with increased soy intake. *Journal of Sexual Medicine*, 2(3), 338-340.
- Arai, Y. (2000). Sexual differentiation of the brain: a historical review. En A. Matsumoto (ed.), *Sexual differentiation of the brain* (1-10). Florida: CRC Press.
- Atanassova, N., Mckinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P. y Sharpe, R.M. (2000). Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, 141(10), 3898-3907.
- Awoniyi, C.A., Roberts, D., Chandrashekar, V., Veeramachaneni, D.N., Hurts, B.S., Tucker, K.E. y Schlaff, W.D. (1997). Neonatal exposure to coumestrol, a phytoestrogen, does not alter spermatogenic potential in rats. *Endocrine* 7(3), 337-341.
- Bar-El, D.S. y Reifen, R. (2010). Soy as an endocrine disruptor: cause for caution? *J Pediatr Endocrinol Metab* 23(9), 855-861.
- Bedolla Godínez, Y. (1999). Efecto del coumetrol en la organización histológica del testículo fetal. (Servicio social, Licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Bennetts, H.W., Underwood, E.J. y McKeown, N.R. (1946). A specific breeding problem of sheep on Subterranean Clover pastures in Western Australia. *Australian veterinary journal* 22, 2-12.
- Bernbaum, J.C., Umbach, D.M., Ragan, N.B., Ballard, J., Archer, J.I., Schmidt-Davis, H. y Rogan, W.J. (2008). Pilot studies of estrogen-related physical findings in infants. *Environ Health Perspect*, 116(3), 416-420.
- Bojase, G., Wanjala, C.C. y Majinda, R.R. (2001). Flavonoids from the stem bark of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*, 56(8), 837-842.
- Brown, N.M. y Setchell, K.D. (2001). Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: Implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest*, 81(5), 735-747.
- Burroughs, C.D. (1995). Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally to various doses of coumestrol. *Proc Exp Biol Med.*, 208(1), 78-81.
- Cassidy, A. y Faughnan, M. (2000). Phyto-oestrogens through the life cycle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3), 480-496.
- Cederroth, C.R., Schaad, O., Descombes, P., Chambon, P., Vassalli, J.D. y Nef, S. (2007). Estrogen receptor as a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism. *Endocrinology*, 148(11), 5507-5519.

- Chandraseddy, A., Muneyyirci-Delale, O., McFarlane, S.I. y Murad, O.M. (2008). Adverse effects of phytoestrogens on reproductive health: a report of three cases. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 14(2), 132–135.
- Chavarro, J.E., Toth, T.L., Sadio, S.M., y Hauser, R. (2008). Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod* 23(11), 2584–2590.
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R. y Barnes, S. (1993). Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soy-bean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*, 41(11), 1961–1967.
- Cravedi, J.-P., Zalko, D., Savouret, J.F., Menuet, A. y Bernard, J. (2007). Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Medicine / Science*, 23(2), 98–204.
- D'Aloisio, A.A., Baird D.D., DeRoo, L.A. y Sandler, D.P. (2010). Association of intrauterine and early-life exposures with diagnosis of uterine leiomyomata by 35 years of age in the Sister Study. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 375–381.
- Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Chang, H.C., Newbold, R.R. y Delclos, K.B. (2001). Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol*, 15(2), 105–110.
- Faber, K.A. y Hughes, C.L. Jr. (1991). The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. *Biol Reprod*. 45(1), 35–49.
- Faber, K.A. y Hughes, C.L. Jr. (1993). Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpubertal castrated female rats. *Reprod Toxicol*, 7(1), 35–49.
- Feet, W.F. y Osman, S.F. (1982). Inhibition of bacteria by the soybean isoflavonoids glyceollin and coumestrol. *Phytopathology*, 72(7), 755–760.
- Forsberg, J.G. y Kalland, T. (1981). Neonatal estrogen treatment and epithelial abnormalities in the cervicovaginal epithelium of adult mice. *Cancer Res.*, 41(2), 721–734.
- Giwerzman, A. (2011). Estrogens and phytoestrogens in male infertility. *Current Opinion in Urology*, 21(6), 519–526.
- Hanson, C.H., Loper, G.M., Kohler, G.O., Bickoff, E.M., Ataylor, K.W., Kehr, W.R., Stanford, E.W., Dudley, J.W., Pedersen, M.W., Sorensen, E.L., Carnahan, H.L. y Wilsie, C.P. (1965). Variation in coumestrol content of alfalfa as related to location variety, cutting, year, stage of growth and disease. *Agric. Res. Sev. U.S. Department of Agriculture Tech Bull* 1333, 1–78.
- Hughes, C.L. Jr. (1988). Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ Health Perpect.*, 78, 171–174.
- Iwamoto, T., Nozawa, S., Yoshiike, M., Hoshino, T., Baba, K., Matsushita, T., Tanaka, S.N., Naka, M., Skakkebaek, N.E. y Jørgensen, N. (2006). Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.*, 21(3), 760–765.
- Jefferson, W.N. y Williams, C.J. (2011). Circulating levels of genistein in the neonate, apart from dose and route, predict future adverse female reproductive outcomes. *Reproductive Toxicology*, 31(3), 272–279.
- Jefferson, W.N., Patisaul, H.B. y Williams, C.J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*, 143(3), 247–260.

- Jégou, B., Auger, J., Multigner, L., Pineau, C., Thonneau, P., Spira, P. y Jouannet. (1999). The saga of the sperm count decrease in humans wild and farm animals. En C. Gagnon (ed.), *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications* (pp. 445–454). Vienna, IL: Cache River Press.
- Kallela, K., Heinonen, K. y Saloniemi, H. (1984). Plant oestrogens, the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nord Vet med*, 36(3-4), 124–129.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., y Tilson, H.A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 104 (Suppl 4), 715-740.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., Van der Burg, B. y Gustaffson, J.K. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139(10), 4252-4263.
- Le Bars, P., Le Bars, J. y Brice, G. (1990). Presence, accumulation et devenir du coumestrol dans la luzerne et ses derives. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 166(5), 463-469.
- Levy, J.R., Faber, K.A., Ayyash, L. y Hughes, C.L. (1995). The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Exp Biol Med.*, 208(1), 60-66.
- Lewis, R.W., Brooks, N., Milburn, G.M., Soames, A., Stone, S., Hall, M. y Ashby, J. (2003). The effects of the effects of the phytoestrogens genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci.*, 71(1), 74-83.
- Livingston, A.L., Bickoff, E.M., Guggolz, J. y Thompson, C.R. (1961). Alfalfa Estrogens, Quantitative Determination of Coumestrol in Fresh and Dried Alfalfa. *J Agric Food Chem.*, 9(2), 135-137.
- Loper, G.M. y Hanson, C.H. (1964). Influence of controlled environmental factors and two foliar pathogens on coumestrol in alfalfa. *Crop Science*, 4, 480-482.
- Ma, L. (2009). Endocrine disruptors in female reproductive tract development and carcinogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(3), 357–363.
- Medina Blanco, M., Peinado Lucena, E. y Gómez-Castro, A.G. (1982). Modificaciones estacionales del contenido estrogénico de pastos naturales. *Archivos de zootecnia*, 31(120), 193-204.
- Medina Blanco, M., Peinado Lucena, E. y Gómez-Castro, A.G. (1982a). Isoflavonas estrogénicas en especies espontáneas del género trifolium. *Archivos de zootecnia*, 31(121), 269-280.
- Milligan, S.R., Khan, O. y Nash, M. (1998). Competitive Binding of Xenobiotic Oestrogens to Rat Alpha-Fetoprotein and to Sex Steroid Binding Proteins in Human and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Plasma. *General and Comparative Endocrinology*, 112, 89-95.
- Milligan, S.R., Khan, O. y Nash, M. (1988). Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol*, 1(112), 89-95.
- Montes de Oca Ortiz, E. (1999). Efecto del coumetrol en la organización histológica del ovario fetal. (Servicio social, Licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

- Moon, H.J., Seok, J.H., Kim, S.S., Rhee, G.S., Lee, R.D., Yang, J.Y., Chae, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.Y., Chung, J.Y., Kim, J.M. y Chung, S.Y. (2009). Lactational coumestrol exposure increases ovarian apoptosis in adult rats. *Arch Toxicol*, 83(6), 601-608.
- Morales-Otal, A., Ferreira-Nuño, A., Olayo-Lortia, J., Barrios-González, J. y Tarragó-Castellanos, R. (2016). Effects of neonatal treatment with two phytoestrogens on male rat sexual behavior and partner preference. *Behav Pharmacol*, 27(7), 570-578.
- Moutsatsou, P. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens)*, 6(3), 173-193.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S. y Welshons, W.V. (1998). The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 217(3), 300-309.
- North, K. y Golding, J. (2000). A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hipospadias. The ALSPAC Study Team. Avon longitudinal Study of pregnancy and childhood. *BJU Int.*, 85(1), 107- 113.
- Rolfe, B.G. (1988). Flavones and isoflavones in inducing substances of legume modulation. *Biofactors*, 1(1), 3-10.
- Romero R., C.M., Tarragó Castellanos, M.R., Muñoz Mendoza, R., Arista Reyes, R. y Rosado García, A. (1997). Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfa con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México*, 28(1), 25-30.
- Rossiter, R.C., y Bech, A.B. (1966). Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.) I. Effects of temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*, 17(1), 29-37.
- Rossiter, R.C. y Bech, A.B. (1966a). Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in Subterranean clover. II. Effects of phosphate supply. *Australian Journal of Agricultural Research*, 17(4), 447-456.
- Sakuma, Y. (2009). Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 410-414.
- Setchell, K.D. (2000). Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr.*, 130(3), 654S-655S.
- Setchell, K.D., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L. y Tarr, M.J. (1987) Dietary estrogens – a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93(2), 225-233.
- Setchell, K.D. y Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of nutrition*, 129(3), S758-S767.
- Setchell Kennet, D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. y Heubi, J. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, 350, 23-27.
- Shirataki, Y., Matsuoka, S., Komatsu, M., Ohyama, T.T. y Linuma, M. (1999). Four isoflavanones from roots of *Sophora tetraptera*. *Phytochemi*, 50, 695-702.
- Shutt, D.A. y Cox, R.I. (1972). Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors. *Journal Endocrinology*, 52(2), 299-310.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E. y Main, K.M. (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with Environmental aspects. *Hum Reprod.*, 16(5), 972-978.

- Song, W.O., Chun, O.K., Hwang, I., Shin, H.S., Kim, B.G., Kim, K.S., Lee, S.Y., Shin, D. y Lee, S.G. (2007). Soy isoflavones as safe functional ingredients. *J Med Food*, 10(4), 571-578.
- Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srail, S.K. y C Rice-Evans (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*. 458(2), 224-230.
- Sukumaran, K. y Gnanamanickam, S.S. (1980). Isolation of antifungal compounds from Indian fodder legume plants. *Indian J. Microbiol*, 20(3), 204-207.
- Tarragó-Castellanos, C.R., García-Lorenzana, C.M., Díaz-Sánchez, V. y Velázquez-Moctezuma, J. (2006). Gonadotrophin levels and morphological testicular features in rats after different doses of the phytoestrogen coumestrol. *Neuro Endocrinol Lett*, 27(4), 487-492.
- Temple, J.L., Fugger, H.N., Li, X., Shetty, S.J., Gustafsson, J. y Rissman, E.F. (2001). Estrogen Receptor β regulates Sexually Dimorphic Neural Responses to Estradiol. *Endocrinology*, 142(1), 510-513.
- Thigpen, J.E., Setchell, K.D., Ahlmark, K.B., Locklear, J., Spahr, T., Caviness, G.F., Goelz, M.F., Haseman, J.K., Newbold, R.R. y Forsythe, D.B. (1999). Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci.*, 49(5), 530-536.
- Toppari, J., Larsen, J. Ch., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J. Jr., Jegou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J. y Skakkebaek, N. E. (1996). Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 104(Suppl 4), 741-803.
- Whitten, L.P. y Naftolin, F. (1992). Effects of a phytoestrogens diet on estrogen dependent reproductive processes in immature female rats. *Steroids*, 57, 56-61.
- Whitten, L.P., Lewis, C. y Naftolin, F. (1993). A phytoestrogen diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Biol Reprod*, 49(5), 1117-1121.
- Whitten, P.L. y Patisaul, H.B. (2001). Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environmental Health Perspective*, 109(suppl 1), 5-20.
- Wisniewski, A.B., Klein, S.L., Lakshmanan, Y. y Gearhart, J.P. (2003). Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J Urol*, 169(4), 1582-1586.
- Wuttke, W., Jarry, H. y Seidlova-Wuttke, D. (2007). Isoflavones-safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev*, 6(2), 150-188.
- Young, W.C., Goy, R.W. y Phoenix, C.H. (1964). Hormones and sexual behavior. *Science* 143(3603), 212-218.
- Zung, A., Glaser, T., Kerem, Z. y Zadik, Z. (2008). Breast development in the first 2 years of life: an association with soy-formulas. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, 46(2), 191-195.

IMPLICACIONES ACTUALES DE LA OBESIDAD EN LA FERTILIDAD MASCULINA

Lorena Ruiz Valderrama,¹
Román Espinosa Cervantes,²
Irerí Fragoso Hernández,³
Isabel Arrieta Cruz,⁴
Humberto González Márquez,⁵
Ma. del Rosario Tarragó Castellanos,⁶
Leticia González Núñez,⁶
Marcela Arteaga Silva⁶ y
Edith Arenas Ríos⁶

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

² Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM Xochimilco.

³ Maestría en Biología de la Reproducción Animal, UAM Iztapalapa.

⁴ Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátrica.

⁵ Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM- Iztapalapa.

⁶ Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa.

1. Introducción

En México, la obesidad es una condición metabólica compleja y perjudicial para niños y adultos que induce una variedad de patologías, entre las que se encuentra la infertilidad masculina (Palou y Bonet, 2013). Los efectos adversos de la obesidad también se presentan en las mujeres, los cuales han sido explicados claramente, a diferencia del macho, en quienes son poco claros debido a los resultados contradictorios que varios autores han reportado (Hall *et al.*, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona estadísticas y predijo que aproximadamente 2.3 billones de adultos estarían dentro de la clasificación de sobrepeso y 700 millones en la de obesidad durante 2015. Una de las causas de la obesidad se relaciona con el estilo de vida, como el sedentarismo, que se convierte en un importante factor de riesgo para presentar desordenes reproductivos.

2. Etiología de la obesidad

La definición más clara y más empleada para hablar de la obesidad es que se trata de presencia de exceso de grasa en el tejido adiposo, causado por el desequilibrio entre las calorías ingeridas y las gastadas por el individuo (Cachofeiro *et al.*, 2006), al igual que un estado de inflamación crónica de bajo grado (Blancas *et al.*, 2010). Sin embargo, se sabe que sus causas pueden derivar de la relación de múltiples factores endógenos y exógenos, como el

genotipo o estilo de vida, que hasta la actualidad son escasamente conocidos y comprendidos, y que de no continuarse su estudio podrían perpetuar el fenotipo de esta condición.

2.1 Procesos metabólicos involucrados en la obesidad

Las reservas energéticas siempre han sido necesarias para el organismo; sin embargo, éstas son bien aprovechadas cuando interactúan diferentes procesos interconectados, como el control de la energía consumida, la distribución de nutrientes entre los tejidos, los procesos anabólicos y catabólicos, la adipogénesis y la termogénesis.

En humanos, la obesidad puede caracterizarse por el aumento en el número de adipocitos (hiperplasia), o por el incremento de tamaño de dichas células (hipertrofia). Por supuesto, esto trae consigo otras complicaciones metabólicas, como en la función adipogénica (Couillard *et al.*, 2000), ya que el tejido adiposo en tanto órgano endocrino puede secretar algunos péptidos llamados adipocinas. La obesidad está particularmente vinculada con la presencia de marcadores moleculares, como la proteína reactiva C (CRP), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), asociados a una inflamación crónica de bajo grado y resistencia a la insulina que caracteriza a los individuos con obesidad. No obstante, se ha reportado que sólo TNF- α causa resistencia a la insulina en el caso de los roedores, pero no en humanos (Hotamisligil *et al.*, 1993). Los bajos niveles de adiponectina también es indicador de un metabolismo deteriorado (Fruhbeck, 2004).

2.2 Genética y obesidad

La obesidad se encuentra genéticamente regulada. Así, se sabe que existe una variedad de genes para heredarla, los cuales tienen alta probabilidad de resultar en el fenotipo de obesidad (Herrera *et al.*, 2011). Estos genes han sido propuestos con base en ciertos criterios, tanto biológicos como farmacológicos,

utilizando modelos murinos de obesidad, knockout y transgénicos (Sandholt *et al.*, 2012). A partir de estos estudios se han sugerido al menos 127 genes de obesidad relacionados con el control del balance energético, la adipogénesis, la termogénesis adaptativa y la señalización de la insulina. Incluso, algunos estudios han identificado hasta 40 lugares en el gen vinculados con la obesidad en humanos, entre la grasa corporal y el gen asociado a la obesidad (OTF), por ser el que más se replica, de acuerdo con análisis estadísticos (Rankinen *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de los avances en la genética de la obesidad y los lugares en el gen identificados, sólo son 2-4% del total de las diferentes formas de obesidad que pueden heredarse ($\approx$ 40-70%). Por lo tanto, la expresión final de genotipos para determinar el fenotipo obeso se relaciona con factores externos, como el ambiente (Sandholt *et al.*, 2012).

2.3 Alimentación y estilo de vida

Otra de las causas de la obesidad, y quizás la más importante, es la accesibilidad y palatabilidad a las comidas abundantes y con alto contenido de grasa y/o carbohidratos. Los estilos de vida actuales en México, en diversas ocasiones, impiden una adecuada alimentación; por ejemplo: el trabajo de oficina, el doméstico u horarios demandantes que implican poco ejercicio físico e impiden cualquier actividad que requiera un alto gasto de energía (Palou y Bonet, 2013).

Hay factores ambientales y psicológicos que pueden influir en un fenotipo de obesidad. El cerebro desempeña un importante papel en la alimentación: regula el consumo y el balance energético, que consiste en controlar la cantidad y calidad de las calorías ingeridas, mediante las vías de señalización de saciedad, conectadas con la cantidad de alimento y de los depósitos de energía, a través de las señales de adiposidad, como la insulina y la leptina (Wood *et al.*, 2009).

Incluso, independientemente de la disponibilidad del alimento, el factor social también es importante, la memoria de experiencias pasadas, elementos

hedónicos, entre otros, que son controlados por el cerebro (Petrovich *et al.*, 2012). Es por eso que uno de los propósitos fundamentales en el estudio de la obesidad ha sido descifrar los mecanismos cerebrales dependientes del factor ambiental que motivan a comer, es decir, no fisiológicos, pero que a su vez están ligados a la regulación de la ingesta de alimento.

Escasos estudios reportan la relación de la obesidad de los sujetos que la presentan con alteraciones en los mecanismos neurológicos y de comportamiento, por ejemplo, la recompensa de comida en alguna situación es similar a lo que ocurre con los fármacos y la adicción (Palou y Bonet, 2013). Al favorecer respuestas neurofisiológicas por estos mecanismos se obtiene un sobreconsumo de alimento (en donde además también influyen factores como la publicidad) (Priego *et al.*, 2010).

3. Mecanismos propuestos en la obesidad e infertilidad masculina

3.1 Efecto negativo sobre los testículos

En los testículos es donde se lleva a cabo la espermatogénesis, es decir, la formación de gametos masculinos denominados espermatozoides. Ésta ha sido definida como un proceso complejo, largo y muy ordenado de división y diferenciación celular, que se encuentra bajo la regulación de señales endocrinas en las que participan la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la hormona luteinizante (LH), inhibina y la hormona folículo estimulante (FSH), así como a través de señales paracrinas derivadas de la interrelación entre distintos tipos de células de los túbulos seminíferos (células de Sertoli) y del intersticio (células de Leydig) y de señales autocrinas (Hurtado y González, 2011). En todo este proceso la testosterona (T) ostenta un papel fundamental.

La T es la hormona de origen esteroideo más importante en los machos y tiene una función crítica en el desarrollo testicular, la

espermatogénesis y el desempeño normal de la masculinización (Zhao *et al.*, 2014). Al interior de los túbulos seminíferos esta hormona alcanza concentraciones cien veces mayor a la circulante en la sangre (Ruwanpura *et al.*, 2010) y es secretada por las células de Leydig bajo la estimulación de la LH (McLachlan *et al.*, 2002). Se sabe que el hipogonadismo primario o secundario es causado por la baja producción de T y la obesidad es una causa directa de la modificación en las concentraciones hormonales (De Maddalena *et al.*, 2012), ya que se ha reportado que está asociada con niveles bajos de T en plasma (Tsai *et al.*, 2004).

Con la finalidad de confirmar la relación entre obesidad y fertilidad masculina se han examinado parámetros seminales: movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática, a partir de lo cual se ha reportado que niveles bajos de T en plasma tienen que ver con la disminución de la movilidad espermática (Saboore Aftab *et al.*, 2013), daño a las células de Leydig con incremento de apoptosis (Vigueras *et al.*, 2011) y reducción del peso de las gónadas (testículo-epidídimo) en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasas (Hurtado, 2011).

Otros estudios sugieren que existe una correlación negativa significativa entre el índice de masa corporal (IMC) y parámetros seminales como el conteo espermático. Se ha reportado en individuos con IMC en el rango normal (IMC 20-25 kg/m²) presentan un conteo espermático de 102.5×10^6 , mientras que aquellos con obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²) lo presentan de 66×10^6 ; también se ha advertido una reducción en el porcentaje de movilidad espermática, identificando en sujetos con IMC en rango normal un porcentaje de $40.9 \pm 1.01\%$ y en individuos obesos $38.1 \pm 2.06\%$ (Chavarro *et al.*, 2010), mientras que respecto de la morfología se reporta un conteo de espermatozoides normales de 6.48×10^6 en individuos con IMC normal y un valor de 3.30×10^6 en los obesos (Martini *et al.*, 2010). Estos cambios pueden estar directamente relacionados con la alteración de la espermatogénesis, debido precisamente a la modificación de los niveles de hormonas sexuales en individuos obesos, ya que existe

una reducción en los niveles de T en comparación con los que presentan IMC normal ($16.5 \pm 0.26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $15.7 \pm 0.44 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), así como también una disminución en los niveles plasmáticos de LH en obesos (de $4.7 \pm 0.24 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$ en sujetos con IMC normal, a $4.4 \pm 0.33 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$ en aquellos con obesidad) (Paasch *et al.*, 2010).

También se ha encontrado un alto porcentaje de alteración seminal en la que se registra un elevado número de espermatozoides con formas anormales en ratones obesos (Adham *et al.*, 2001), afirmando una vez más que la obesidad puede alterar la espermatogénesis (Fan *et al.*, 2015), ya que más allá de la perturbación hormonal, también hay un deterioro de la barrera hematotesticular (BHT), la cual consiste en componentes anatómicos/físicos, fisiológicos e inmunológicos que son necesarios en el funcionamiento de dicha estructura en el testículo. La principal función de esta barrera es crear el microambiente para la correcta espermatogénesis y el desarrollo de las células germinales (mitosis, meiosis y diferenciación) (Mital *et al.*, 2011).

Se ha observado a un nivel ultraestructural que la obesidad, en lo que respecta a las uniones estrechas entre células de Sertoli (que forman la BHT), favorece que se presente una discontinuidad entre ellas, lo que indica que la integridad de la BHT se encuentra severamente comprometida (Fan *et al.*, 2015). El análisis de la morfología testicular ha demostrado que el epitelio de los túbulos seminíferos en ratones obesos está seriamente desorganizado y atrófico, así como también se ha observado una disrupción de las adhesiones entre células de Sertoli y células espermatogénicas (Fan *et al.*, 2015). Esto, debido posiblemente a la disminución de los niveles de testosterona en plasma, afectando de negativamente el mantenimiento de la BHT, así como su función y participación en la espermatogénesis (Mital *et al.*, 2011).

La relación del tejido adiposo con la reproducción se debe a la participación de los andrógenos (fig. 1), por lo que si se altera la concentración de testosterona, puede provocar un cambio del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, estrés oxidativo y efectos negativos sobre la esteroidogénesis testicular.

3.2 Efecto negativo sobre el epidídimo

En la actualidad se han reportado los posibles efectos negativos de la obesidad sobre el epidídimo. Resultados de un análisis histológico muestran que el lumen y epitelio del epidídimo de rata con obesidad presenta un número mayor de cuerpos apoptóticos. El epidídimo es un órgano importante en el que los espermatozoides adquieren el potencial fertilizante, que al ser afectado compromete la funcionalidad óptima del gameto masculino (Cooper 2007).

Algunos estudios han indicado que una lipomatosis escrotal (aumento de los depósitos de grasa a nivel subcutáneo y alrededor del escroto) puede favorecer un aumento de la temperatura local y esto generar un ambiente de estrés oxidante en el espermatozoide; es decir, se provoca un desequilibrio entre los radicales libres y enzimas antioxidantes del espermatozoide (Kasturi *et al.*, 2008).

Un ejemplo de lo anterior lo demostraron Vigueras *et al.*, (2011), determinando lipoperoxidación a través del incremento del malondialdehído (MDA, producto de la peroxidación lipídica) en ratas obesas, 4.74 ± 0.63 vs 2.38 ± 0.22 MDA, en controles. Es importante recordar que la lipoperoxidación es resultado del estrés oxidante presente en el epidídimo, además de observar apoptosis.

Al final del estudio se encontró que en rata macho con obesidad la morfología de la cabeza y cola del epidídimo aparentemente no se ve afectada. La inmunopositividad a los receptores de andrógenos en el núcleo de la mayoría de las células y en algunas células basales se observó tanto en ratas obesas como controles, lo que significa que la obesidad no afecta a los receptores de andrógenos ni a los espermatozoides ubicados en el lumen tubular. Sin embargo, se detectaron cuerpos apoptóticos en el lumen de la cabeza del epidídimo de ratas obesas, en varias secciones de epitelio de la cabeza del epidídimo y en el lumen tubular de ratas con obesidad (Vigueras *et al.*, 2011).

No obstante, hasta la fecha no se han reportado trabajos que profundicen las afecciones de la gordura sobre el proceso por el que los

espermatozoides adquieren la capacidad para fertilizar al ovocito a medida que avanzan a través del epidídimo, maduración espermática epididimaria. Es por eso que parte de estas indagaciones se han comenzado en nuestro grupo de investigación, determinando las modificaciones postraduccionales de los espermatozoides que ocurren como parte del proceso maduracional, entre los que se encuentran los glicoconjugados en la membrana del espermatozoide y la fosforilación de proteínas, así como técnicas para esclarecer si el aumento de la temperatura escrotal favorece un proceso de estrés oxidante en el espermatozoide epididimario (Vigueras *et al.*, 2011).

Múltiples mecanismos están involucrados en la maduración espermática epididimaria y muchos de ellos (cambios en la composición de lípidos, restructuración del acrosoma, incremento de la carga negativa total, modificación de las proteínas de superficie, reorganización en las proteínas de membrana, adquisición de la movilidad y potencial fertilizante) pueden verse afectados por la obesidad, así que tan sólo esta es una pequeña parte de lo que falta por dilucidar.

4. Obesidad e inflamación

Se ha reportado que una de las causas de un estado de inflamación crónica de bajo grado, como es la obesidad, es la reserva excesiva de tejido adiposo (Gómez *et al.*, 2005). Es importante recordar que aunque este tipo de inflamación no responde a las características de una respuesta inflamatoria clásica, en la obesidad se presentan algunos marcadores (Catalán *et al.*, 2007). Uno de ellos es la concentración de las adipocinas, que pueden alterarse, desencadenando patologías como la diabetes tipo 2 (Calle y Kaaks 2004).

Otros marcadores son los proinflamatorios (interleucinas 1 α , 2 β , 6, 8 y el factor de necrosis tumoral [TNF α , β] y el γ -interferón), que reclutarán al sistema inmune para tratar de contrarrestar la inflamación (Yang y Ming, 2011). Sin embargo, la infiltración de células del sistema inmune –por ejemplo, los macrófagos que forman estructuras especializadas que rodean

a los adipocitos muertos– amenazan con afectar al funcionamiento óptimo del tejido adiposo, como un órgano endocrino que regula el metabolismo y la reproducción (Yang y Ming, 2011). Por lo tanto, es de suma importancia hablar de la respuesta inflamatoria asociada a la obesidad y algunos blancos terapéuticos, entre ellos el proceso de termogénesis. Conviene recordar que todo organismo trata de mantener un equilibrio dinámico, conocido como homeostasis; cuando existe un estresor, en este caso una ganancia desmedida de energía que causa inflamación, el organismo buscará recuperar su homeostasis y una de las maneras conocidas es la respuesta inmune para contrarrestar dicho proceso inflamatorio. Por otro lado, la termogénesis como capacidad de un organismo para producir calor es un importante componente para el consumo de energía. Este proceso es modulado por tres principales factores: temperatura ambiental, cantidad y calidad de nutrientes, e inflamación sistémica.

4.1 Termogénesis

El tejido adiposo marrón (TAM) es capaz de llevar a cabo la termogénesis adaptativa, que es la producción de calor regulada, mediada catabólicamente por los sustratos energéticos y la liberación de energía química a partir del rompimiento de adenosín trifosfato (ATP). Este rompimiento de energía es posible gracias a una proteína desacoplante 1 (UCP-1), presente en la membrana interna mitocondrial de los adipocitos marrones. Esta proteína, como su nombre lo indica, se encarga de desacoplar la producción de adenosín trifosfato de las vías catabólicas de lípidos y carbohidratos (Long *et al.*, 2014), es únicamente expresada en TAM, por lo que un aumento del TAM puede favorecer en pacientes obesos la disipación de energía (Montanari Poscic *et al.*, 2017).

El proceso de termogénesis es controlado por el sistema nervioso simpático (SNS), el que depende de receptores β adrenérgicos que a su vez regulan los efectos de la norepinefrina y catecolaminas. Los tres factores

esenciales que determinan este proceso son la temperatura ambiental (como el frío, que puede inducir la termogénesis), la cantidad y calidad de nutrientes (la dieta es capaz de estimularla) y la inflamación sistémica en respuesta a daño tisular e infección (como la fiebre) (Virtanen *et al.*, 2009).

Ya se ha reportado un aumento de la norepinefrina en el corazón, debido al tejido adiposo blanco (TAB) y TAM en respuesta a estímulos termogénicos causados por la dieta y el frío. También la unión de catecolaminas a receptores β adrenérgicos del tejido adiposo marrón que activan al programa termogénico, incluyendo la inducción de lipólisis y la actividad de (UCP)-1, y la expresión de genes (Montanari *et al.*, 2017).

La señalización de receptores β -adrenérgicos en TAB juegan un papel importante, sustentando el proceso de termogénesis y suministrando ácidos grasos, como sustrato de la lipólisis, siendo transportados a TAM por un aumento del flujo sanguíneo (Cannon y Nedergaard, 2004). La energía derivada es liberada por TAM en forma de calor, que se disipa por el cuerpo gracias a su vascularización y junto con algunos factores endógenos (Montanari *et al.*, 2017).

Es por eso que en individuos con obesidad la conversión de energía de TAB a TAM, a través de los factores endógenos participantes en TAM, puede ser un blanco terapéutico para dar solución a esta condición generada por el desbalance de energía (fig. 2) y así evitar que la obesidad se convierta en un factor más de patologías como la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y la infertilidad masculina y femenina.

5. Síndrome metabólico asociado a la infertilidad masculina

Otro problema de salud causado por el desbalance de energía es el síndrome metabólico (SM), que engloba un conjunto de desórdenes, incluyendo la obesidad, dislipidemia, hipertensión, diabetes y enfermedades vasculares. Además, en el hombre causa hipogonadismo, disfunción eréctil y desbalance psicológico (Michalakis *et al.*, 2013).

Como parte de la relación entre obesidad, SM e infertilidad, se ha descrito que la hiperinsulinemia e hiperglucemia son común denominador en los individuos obesos y en los roedores empleados en estudios sobre el tema (Kasturi *et al.*, 2008). Estos dos padecimientos han mostrado tener un efecto inhibitorio en la cantidad y calidad espermática, advertido en la baja fertilidad vista en varones con obesidad (Lotti *et al.*, 2013).

Los efectos adversos en la fertilidad masculina se producirían mediante tres mecanismos: a) la conversión periférica de T a estrógenos en el tejido adiposo, lo que puede causar hipogonadismo secundario a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG); b) el estrés oxidante a nivel del microambiente testicular, que puede resultar en una disminución de la espermatogénesis y daño espermático; c) la acumulación suprapúbica de tejido adiposo y la grasa interna del muslo pueden derivar en un aumento de la temperatura escrotal (35°C) en varones con obesidad severa (Filippi *et al.*, 2009).

Los pulsos de la GnRH y el funcionamiento normal del eje HHG dependen del balance energético normal y en caso de un desbalance de energía puede ocurrir un daño en el eje reproductivo. Por ejemplo, cuando se presenta hiperinsulinemia, afecta al hígado y es considerada la mayor determinante de la disminución en las concentraciones de la proteína de unión a andrógenos (SHBG). Cuando hay una reducción en las concentraciones de T no es posible la unión con SHBG, debido a la hiperestrogenemia que baja los pulsos de la LH (Michalakis *et al.*, 2013).

Es así que la relación entre un índice de masa corporal $>30 \text{ kg/m}^2$ y la hormona SHBG se ha fortalecido por lo observado en varones, que al perder peso la SHBG aumenta su capacidad de unión y los niveles en plasma regresan a su rango normal (Michalakis *et al.*, 2013). En la mayoría de los estudios, los individuos obesos presentan disminución de T. Además, el síndrome metabólico se ha asociado a cambios termooxidativos, a raíz de la acumulación de tejido adiposo en el área suprapúbica o región abdominal y en el muslo, causando una temperatura escrotal elevada y afectando la espermatogénesis (Michalakis *et*

al., 2013). Por lo tanto, se considera que esta acumulación de tejido adiposo está relacionada con el aumento del estrés oxidativo y la lipoperoxidación. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), al causar lipoperoxidación, se convierten en compuestos tóxicos para el espermatozoide humano, posicionando al estrés oxidativo como una causa de la infertilidad masculina (Kasturi *et al.*, 2008).

6. Disfunción eréctil como consecuencia de la obesidad

La disfunción eréctil (DE), o incapacidad de un hombre de conseguir o mantener una erección firme durante la relación sexual, es una de las principales causas que disminuyen la calidad seminal en la vida de un individuo, lo cual afecta a aproximadamente 30 millones de varones (Traish *et al.*, 2009). En un estudio se reporta que la disfunción eréctil severa o moderada está presente en 12% de hombres menores de 59 años; 22% en hombres de 60 a 69 años y 30% en mayores de 69 años. No obstante, en aquellos con IMC >29 presentan este problema o tienen 30% de riesgo de padecerlo (Gunduz *et al.*, 2004).

La obesidad se ha vinculado directamente con la disfunción endotelial y con el aumento en las concentraciones séricas de marcadores vasculares de inflamación, y tanto la DE como la disfunción endotelial comparten algunas vías metabólicas y vasculares. Los hombres obesos con DE son evidencia de una disfunción endotelial, los indicadores de ésta son elevadas concentraciones séricas de marcadores de inflamación, como IL-6 e IL-8, proteína reactiva C (PRC). Al realizar un estudio en 110 hombres obesos, se advirtió la relación entre el índice que determina la DE y los índices de disfunción endotelial, apoyando la presencia de vías vasculares que tienen en común (Somani *et al.*, 2010). Por lo cual, es probable que el hipogonadismo y el aumento del riesgo cardiovascular, junto con la obesidad, puedan justificar la alta prevalencia de DE en individuos con sobrepeso y obesidad (Mah y Wittert, 2010).

Se ha propuesto una medida de control basándose en las conductas que siguen tanto hombres como animales al recibir placer o al evadir las que causan alguna inconformidad. Esta medida de control es que si se les asegura una vida sexual placentera, se fomentaría un apego a la dieta y al ejercicio. Experimentar insatisfacción sexual debido a la impotencia constituye una motivación para consultar a especialistas y esto trae consigo la oportunidad de tratar a los pacientes obesos con DE (Bacon *et al.*, 2003).

Es importante puntualizar que la obesidad es una condición multifactorial e incluso el aspecto psicológico puede desempeñar un papel importante. La pérdida de peso, aunada a cambios en el estilo de vida, pueden aminorar la DE en hombres obesos. Tal es el ejemplo del estudio realizado en Massachusetts, donde hombres con sobrepeso que presentan un gran riesgo de padecer DE, al bajar de peso, disminuyen dicho riesgo. De igual forma, aquellos que realizan alguna actividad física a la mitad de su vida tienen 70% de no padecerla, en comparación con quienes no lo hacen (Isidori *et al.*, 2014).

=====

Figura 1. Participación de TAB en la regulación del eje HHP. Las kisspeptinas estimulan la liberación de GnRH, esta hormona propiciará la liberación de FSH y LH de la adenohipófisis para ejercer su efecto en la gónada (testículo), en donde favorecerá la secreción de T, que más tarde será convertida a estradiol por la P450 aromatas. La FSH, además, es regulada por la Inhibina B, que es sintetizada por las células de sertoli. En TAB se secreta estradiol y leptina, las cuales participan regulando el eje HHG y la secreción de T. Las kisspeptinas también estimulan la liberación del neuropéptido Y, que participa en el balance energético.

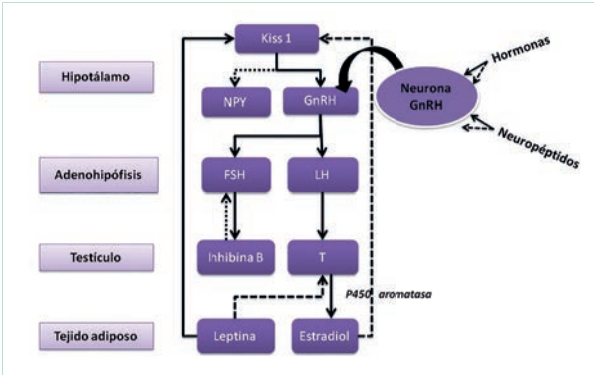
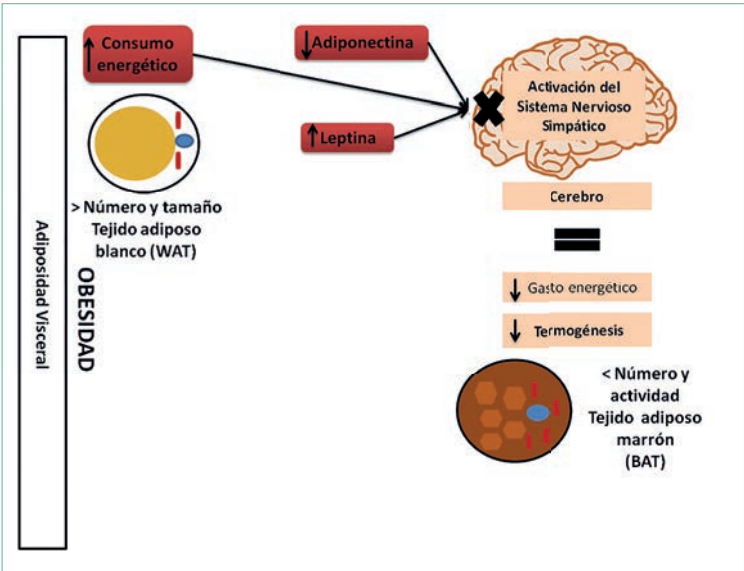


Figura 2. Efecto de la obesidad en el tejido adiposo blanco y marrón. Un aumento de la adiposidad visceral, causado por el incremento en número y tamaño de TAB, alterará la termogénesis, disminuyendo la que ocurre en TAM debido a su pérdida de actividad dirigida por el SNS y favorecida por el aumento de leptina y la reducción de adiponectina, causando una reducción del gasto energético.



Referencias

- Adham, I. M., Nayernia, K., Burkhardt-Gottges, E., Topaloglu, O., Dixkens, C., Holstein, A. F. y Engel, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod*, 7(6), 513-520.
- Bacon, C.G., Mittleman, M.A., Kawachi, I., Giovannucci, E., Glasser, D.B. y Rimm, E.B. (2003). Sexual function in men older than 50 years of age: results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med.*, 139(3), 161-168.
- Cachofeiro, V., Miana, M., Martín-Fernández, B., De las Heras, N. y Lahera, V. (2006). Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. *Rev Esp Obes.*, 4, 195-204.
- Calle, E. y Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 4(8), 579-591.
- Cannon, B. y Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277-359.
- Catalán, V.J., Gómez-Ambrosi, J., Rotellar, C., Silva, A., Rodríguez, J., Salvador, M.J., Gil, J., Cienfuegos, A. y Fruhbeck, G. (2007). Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 39(7), 495-500.
- Cooper, T. G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*, 9(4), 533-539.
- Couillard, C., Mauriege, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C. y Despres, J.P. (2000). Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 24(6), 782-788.
- Chavarro, J.E., Toth, T.L., Wright, D.L., Meeker, J.D. y Hauser, R. (2010). Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*, 93(7), 2222-2231.
- De Maddalena, C., Vodo S., Petroni A. y Aloisi, A.M. (2012). Impact of testosterone on body fat composition. *J Cell Physiol.*, 227(12), 3744-3748.
- Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G., Fan, W., Xu, Y. y Ding, Z. (2015). Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS One*, 10(4), e0120775.

- Filippi, S., Vignozzi, L., Morelli, A., Chavalmane, A. K., Sarchielli, E., Fibbi, B., Saad, F., Sandner, P., Ruggiano, P., Vannelli, G.B., Mannucci, E. y Maggi, M. (2009). Testosterone partially ameliorates metabolic profile and erectile responsiveness to PDE5 inhibitors in an animal model of male metabolic syndrome. *J Sex Med*, 6(12), 3274-3288.
- Fruhbeck, G. (2004). The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2(3), 197-208.
- Gómez A., J., Salvador, J., Silva, C., Rotellar, F., Gil, M.J., Cienfuegos, J.A. y Fruhbeck, G. (2005). Leptin therapy does not affect inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(6), 3803; author reply 3803.
- Gunduz, M.I., Gumus, B.H. y Sekuri, C. (2004). Relationship between metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Asian J Androl*, 6(4), 355-358.
- Hall, A. M., Brunt, E. M., Klein, S. y Finck, B. N. (2010). Hepatic expression of cell death-inducing DFFA-like effector C in obese subjects is reduced by marked weight loss. *Obesity* (Silver Spring), 18(2), 417-419.
- Herrera, B.M., Keildson, S. y Lindgren, C.M. (2011). Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*, 69(1), 41-49.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. y Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Hurtado, V. y González, A.C. N., (2011). Fisiología de la espermatogénesis y la fecundación.
- Isidori, A.M., Buvat, J., Corona, G., Goldstein, I., Jannini, E.A., Lenzi, A., Porst, H., Salonia, A., Traish, A.M. y Maggi, M. (2014). A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment-a systematic review. *Eur Urol*, 65(1), 99-112.
- Kasturi, S.S., Tannir, J. y Brannigan, R.E. (2008). The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl*, 29(3), 251-259.
- Long, J.Z., Svensson, K. J., Tsai, L., Zeng, X., Roh, H.C., Kong, X., Rao, R., Lou, R.J., Lokurkar, I., Baur, W., Castellot, J.J. Jr., Rosen, E.D. y Spiegelman, B. M. (2014). A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab*, 19(5), 810-820.
- Lotti, F., Corona, G., Degli Innocenti, S., Filimberti, E., Scognamiglio, V., Vignozzi, L., Forti, G. y Maggi, M. (2013). Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome in male members of infertile couples. *Andrology*, 1(2), 229-239.
- Mah, P.M. y Wittert, G.A. (2010). Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol*, 316(2), 180-186.
- Martini, A.C., Tissera, A., Estofán, D., Molina, R.I., Mangeaud, A., De Cuneo, M.F. y Ruiz, R.D. (2010). Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1739-1743.

- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., De K, Pratis, K. y Robertson, D.M. (2002). Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl.*, 23(2), 149-162.
- Michalakakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B.C. y Goulis, D.G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 62(4), 457-478.
- Mital, P., Hinton, B.T. y Dufour, J.M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod*, 84(5), 851-858.
- Montanari, T., Poscic, N. y Colitti, M. (2017). Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obes Rev*, 18(5), 495-513.
- Paasch, U., Grunewald, S., Kratzsch, J. y Glander, H. J. (2010). Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril*, 94(7), 2898-2901.
- Palou, A. y Bonet, M. L. (2013). Challenges in obesity research. *Nutr Hosp.*, 28 (suppl 5), 144-153.
- Petrovich, G.D., Hobin, M.P. y Reppucci, C.J. (2012). Selective Fos induction in hypothalamic orexin/hypocretin, but not melanin-concentrating hormone neurons, by a learned food-cue that stimulates feeding in sated rats. *Neuroscience*, 224, 70-80.
- Priego, T., Sanchez, J., Palou, A. y Pico, C. (2010). Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*, 34(5), 809-819.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L. y Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* (Silver Spring), 14(4), 529-644.
- Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I. y Meachem, S.J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol.*, 205(2), 117-131.
- Saboor Aftab, S.A., Kumar, S. y Barber, T.M. (2013). The role of obesity and type 2 diabetes mellitus in the development of male obesity-associated secondary hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 78(3), 330-337.
- Sandholt, C.H., Hansen, T. y Pedersen, O. (2012). Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr Diabetes*, 2(7). doi: 10.1038/nutd.2012.9
- Somani, B., Khan, S. y Donat, R. (2010). Screening for metabolic syndrome and testosterone deficiency in patients with erectile dysfunction: results from the first UK prospective study. *BJU Int*, 106(5), 688-690.
- Traish, A.M., Feeley, R.J. y Guay, A. (2009). Mechanisms of obesity and related pathologies: androgen deficiency and endothelial dysfunction may be the link between obesity and erectile dysfunction. *Febs j*, 276(20), 5755-5767.
- Tsai, E.C., Matsumoto, A. M., Fujimoto, W.Y. y Boyko, E.J. (2004). Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care*, 27, 861-868.

- Viguera V., R.M., Rojas C., J.C., Chávez S., M., Gutiérrez, P.O., García C., M.E., Cuevas, A.O., Reyes R., M.M. y Zambrano, E. (2011). Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica*, 113(2), 214-220.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglin, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S. y Nuutila, P. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1518-1525.
- Wood, I.S., Wang, B. y Trayhurn, P. (2009). IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 384(1), 105-109.
- Yang, Z. y Ming, X.F. (2011). CD36: the common soil for inflammation in obesity and atherosclerosis? *Cardiovasc Res*, 89(3), 485-486.
- Zhao, J., Zhai, L., Liu, Z., Wu, S. y Xu, L. (2014). Leptin Level and Oxidative Stress Contribute to Obesity-Induced Low Testosterone in Murine Testicular Tissue. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-14.

Glosario

ATP: adenosín trifosfato.	LH: hormona luteinizante.
BHT: barrera hematotesticular.	MDA: malondialdehído.
CPU-1: proteína desacoplante 1.	OMS: Organización Mundial de la Salud.
CRP: proteína reactiva C.	OTF: gen asociado a la obesidad.
DE: disfunción eréctil.	SHBG: globulina de unión a hormonas sexuales.
ERO: especies reactivas de oxígeno.	SM: síndrome metabólico.
FSH: hormona foliculo estimulante.	SNP: sistema nervioso parasimpático.
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.	T: testosterona.
HHG: hipotálamo hipófisis gónada.	TAB: tejido adiposo blanco.
IMC: índice de masa corporal.	TAM: tejido adiposo marrón.
ILC-6: interleucina 6.	TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
IL-8: interleucina 8.	

EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE LOS CARBOHIDRATOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE LA RATA WISTAR

Joel Hernández Rodríguez,¹
Sergio Montes López,²
Isabel Arrieta Cruz,³
Edith Arenas Ríos,⁴
Irma Jiménez Morales⁵ y
Marcela Arteaga Silva⁶

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

² Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”.

³ Instituto de Geriátría.

⁴ Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide, Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

⁵ Laboratorio de Andrología, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

⁶ Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva, Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

1. Introducción

En los mamíferos, la reproducción requiere del reconocimiento que ocurre entre dos células que son altamente diferenciadas: el espermatozoide (que es asimétrico y móvil) y el ovocito (que es grande e inmóvil), los cuales originan nuevo individuo; para ello se requiere de: 1) la unión especie-específica del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito, 2) la reacción acrosomal por parte del espermatozoide, 3) la penetración de la capa extracelular del ovocito por parte del espermatozoide, 4) la unión de la membrana del espermatozoide con la del ovocito y 5) la fusión entre gametos (fertilización) (Wassarman *et al.*, 2001). Para que estos eventos se lleven a cabo, se requiere de una sólida estructura tanto en el espermatozoide como en el ovocito, hasta que ocurra la fusión entre los gametos.

En cuanto al gameto masculino, se ha descrito ampliamente que la producción continua y eficiente de éste depende de la proliferación de las espermatogonias y posteriormente su diferenciación a espermatozoides anatómicamente completos (Hess y Renato de Franca, 2008), para lo cual es necesario que el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-testículo funcione coordinadamente, debido a que la espermatogénesis es un proceso altamente complejo, en el que se lleva a cabo una serie ordenada de divisiones –primero mitosis y después meiosis–, que en combinación con la espermiogénesis da lugar a la formación de espermatozoides anatómicamente completos, a partir de espermatogonias, con la participación del adecuado microambiente que es

regulado por las células de Sertoli y las de Leydig, que en conjunto y mediante factores paracrinós, como las citosinas y los agentes de crecimiento, regulan los mecanismos de división y renovación celular, y de la interleucina 1, que es capaz de modular las funciones de las células de Sertoli, teniendo como resultado la adecuada producción y desarrollo de los gametos masculinos en los túbulos seminíferos (Jenardhanan *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2016).

Sin embargo, tras su formación en los túbulos seminíferos y posterior liberación durante la espermiación a la luz del túbulo, los espermatozoides de los mamíferos se dirigen hacia la *rete testis*, para lo cual requerirán de una serie de procesos postesticulares, de modo que sean funcionales dentro del oviducto y puedan ejecutar una eficiente fertilización; es decir, necesitan del paso por una amplia gama de microambientes constituidos por diversos fluidos, cuyo origen y composición los brindarán órganos como el epidídimo, la próstata, la vesícula seminal y el oviducto. Dichos fluidos ejercerán en los espermatozoides una importante sucesión de cambios de maduración que transforman a las células inmóviles –las cuales también son incapaces de fertilizar– en otras vigorosamente activas con la capacidad de unirse y fusionarse con un ovocito, y en el momento adecuado otorgarán a los espermatozoides una inducción que culmine en la adquisición de la capacidad fertilizante (Sostaric *et al.*, 2008).

2. Epidídimo: estructura y función

Se ha descrito al epidídimo como un órgano compuesto por un solo tubo largo y altamente serpentino, cuya longitud varía de acuerdo con cada especie, llegando a ser de 1 m en el ratón, 3 m en la rata, entre 5 y 7 m en el humano y hasta de 70 a 80 m en el caballo (Sostaric *et al.*, 2008; Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015). Durante el desarrollo embrionario, el epidídimo de los mamíferos, al igual que los demás componentes del aparato urogenital, se forma a partir del mesonefros (Sostaric *et al.*, 2008; Robaire y Hinton, 2015), tejido que da origen en animales inferiores a un riñón primitivo. Este

órgano se encuentra ubicado en la parte superior de cada testículo y es por medio de los conductos eferentes que tiene comunicación con la *rete testis*, conectándose por estas vías con el testículo; asimismo, está delimitado con el inicio del conducto deferente (Arrotéia *et al.*, 2012). Cuando es analizado de forma anatómica, el epidídimo se divide generalmente en cuatro regiones: la primera es el segmento inicial, seguido por la cabeza (*caput* o región cefálica), el cuerpo (*corpus* o región media) y la cola (*cauda* o región caudal) (Robaire y Hinton, 2015) (fig. 1); a lo largo de todas ellas, el lumen del epidídimo se encuentra formado por un epitelio pseudoestratificado, integrado por la presencia de diferentes tipos de células: a) principales, b) basales, c) apicales, d) estrechas, e) claras y f) halo. Algunas de ellas, como las principales y basales, pueden encontrarse en todo el túbulo, mientras que las apicales, estrechas, claras y halo (linfocitos intraepiteliales) sólo están presentes en algunos segmentos (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015), con lo que establecen diferentes microambientes. En conjunto, todas las células epiteliales que recubren el conducto del epidídimo forman un entorno fluido luminal, mediante la secreción activa y la absorción de macromoléculas (proteínas, glicoproteínas) que son sintetizadas por la expresión de diferentes genes, además de pequeñas moléculas (azúcares, electrolitos), que unidas a los contenidos derivados de los testículos proporcionan un entorno particular en el que los espermatozoides que recorren el conducto se modifican al entrar en contacto directo con el microambiente luminal, como un requisito del proceso de maduración (Tulsiani, 2006; Robaire y Hinton, 2015), aunado a que son las responsables de eliminar residuos citoplasmáticos y de proteger a los espermatozoides, gracias a la formación de una barrera anatómica e inmunológica durante el recorrido que realizan por todo el túbulo epididimario, al igual que cuando se encuentran almacenados (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

Tras la producción de los espermatozoides por el epitelio de los túbulos seminíferos, se deben dirigir hacia la región de la cabeza y luego al cuerpo del epidídimo, para llevar a cabo su maduración, antes de ser

reunidos y almacenados en la región de la cola (Robaire y Hinton, 2015), por lo cual es importante que en esta zona exista también un ambiente luminal específico que les permita ser recolectados por, incluso, varias semanas, debido a que se mantiene una quiescencia metabólica que previene que en los espermatozoides surja una activación previa a ser eyaculados (Sostaric *et al.*, 2008). La maduración espermática brinda a los espermatozoides la capacidad fertilizante (Dacheux *et al.*, 2009), lo que se refiere a que adquieren el potencial para moverse progresivamente y la capacidad de reconocer y unirse a la zona pelúcida para fecundar a un ovocito (Cornwall *et al.*, 2007; Robaire y Hinton, 2015). Si bien entre las diferentes especies de mamíferos el largo del túbulo del epidídimo es variable, diversas investigaciones señalan que el promedio del tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es altamente parecido y oscila entre 9 y 11 días (Sostaric *et al.*, 2008; Robaire y Hinton, 2015), de manera que su madurez funcional en este órgano puede requerir hasta 12 días en el humano, 13 días en el carnero, de 10 a 11 días en el cerdo y en la rata puede durar entre 8 y 11 días (Robaire y Hinton, 2015). Gran parte de esta variabilidad se debe al tiempo que es requerido para poder llegar a la región de la *cauda*, pues en la mayoría de las especies el tránsito por la región de la cabeza y el cuerpo toma aproximadamente de uno a tres días en cada una, y el movimiento de los espermatozoides por ambas regiones se logra principalmente por las contracciones peristálticas continuas de los músculos lisos que están presentes en la pared de ambas regiones del epidídimo, mientras que en la *cauda* los músculos lisos se encuentran generalmente inactivos, hasta ser estimulados para contraerse.

3. Cambios en el espermatozoide durante la maduración epididimaria

Diversos estudios señalan que para que el espermatozoide de los mamíferos desarrolle la capacidad de desplazarse por el oviducto (adquisición de la movilidad progresiva) y posteriormente pueda reconocer y penetrar a la zona

pelúcida, para finalmente fertilizar y fecundar a un ovocito (Tulsiani, 2006; Dacheux y Dacheux, 2014), es necesario que sucedan cambios en la composición de carbohidratos y proteínas de la membrana plasmática, que modifican las propiedades fisiológicas de los espermatozoides, conforme transitan e interactúan con diversas moléculas que producen las células del epidídimo (Tulsiani, 2006; Sostaric *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2011; Perobelli *et al.*, 2013; Robaire y Hinton, 2015).

Tras la salida del testículo, los espermatozoides cuentan con la estructura anatómica completa que se conoce (fig. 2), es decir, compuesto por una cabeza que contiene al núcleo con el ADN muy compactado entre protaminas y cuyo extremo anterior se encuentra recubierto con el acrosoma (estructura en forma de casquete que contiene enzimas hidrolíticas, cuya participación es relevante durante el proceso de fecundación), y un flagelo, necesario para la movilidad, el cual morfológicamente se divide en cuatro regiones: a) la cabeza con su pieza de conexión, que une a la cabeza con el flagelo, b) pieza media, también llamada cuello, donde están las mitocondrias en un arreglo helicoidal óptimo para generar energía que emplea el axonema (compuesto por nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de los filamentos centrales) y que se extiende a lo largo de la siguiente región; c) la pieza principal, que abarca la mayor parte del flagelo y que se utiliza para la propulsión, mediante ondas de movimiento eficiente, para asegurar el transporte a distancia, y por último, d) parte terminal del flagelo, integrada por una vaina fibrosa (Cooper y Yeung, 2006; Arenas-Ríos *et al.*, 2010). Sin embargo, los espermatozoides aún carecen del potencial fertilizante, por tal motivo requieren de la maduración posttesticular, un proceso complejo y secuencial del que todavía la totalidad de modificaciones que deben experimentar se desconoce; sin embargo, se sabe que en esta transformación, el epidídimo juega el papel principal (Nixon *et al.*, 2014), favoreciendo que ocurra una serie de cambios que propician transformaciones a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, cuyo resultado es un espermatozoide con el potencial de alta movilidad y con la completa capacidad para la fecundación (Palomo-Peiró, 1995; Rodríguez-Tobón, 2016).

3.1 Cambios morfológicos

Para algunas especies de mamíferos, uno de los aspectos importantes en la maduración epididimaria es la migración y posterior pérdida de la gota citoplasmática (GC), la cual puede permanecer en el espermatozoide después de la liberación del epitelio germinal en la espermiación, pues generalmente la mayoría de citoplasma de la espermátida durante su elongación es fagocitado como “cuerpo residual” por la célula de Sertoli (Cooper, 2011). En un estudio morfológico de espermatozoides humanos eyaculados con diversas alteraciones se demostró que existen dos tipos de citoplasma en las células espermáticas: uno que representa el citoplasma remanente, el cual se puede localizar unido a cualquier parte del flagelo del espermatozoide, y la “verdadera” GC, que se presenta de manera más estable en la región del cuello del espermatozoide, mientras que en los espermatozoides del epidídimo de ratón, la GC se ubica en la pieza media del flagelo (Cooper, 2005), por lo que la diferencia en la morfología y la posición de las GC entre espermatozoides humanos y de ratón refleja diferencias entre especies (Xu *et al.*, 2003). Sin embargo, en los de la rata albina se ha reportado que la GC se pierde durante la espermiación (O'Donnell *et al.*, 2011), aunque es posible que en regiones del epidídimo todavía se observe como consecuencia de alguna alteración que sucedió en la espermiación, por lo que es necesario que las células del túbulo epididimario fagociten la GC. Al respecto, se ha descrito que el porcentaje de espermatozoides con GC disminuye notablemente conforme avanzan de la región de la cabeza hacia la cola del epidídimo (Cooper y Yeung, 2006; Arroiteia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015). De igual manera, el epidídimo propicia que se modifiquen las uniones entre las protaminas, que son nucleoproteínas, entre las cuales está el ADN o genoma masculino, por un incremento en la cantidad de puentes disulfuro (Cooper y Yeung, 2006), lo que permite que la información genética que transporta el espermatozoide esté dentro de un núcleo altamente compactado y estable, por lo que a su vez hay una disminución gradual en el tamaño de la cabeza del espermatozoide, tras estar en la región

de la cabeza y ser conducido hacia la cola del epidídimo. También se ha documentado que durante la maduración epididimaria hay una reducción en el tamaño del acrosoma que recubre al núcleo del espermatozoide, tras la reorganización de diversas enzimas y otras proteínas que contiene (Cooper y Yeung, 2006; Arrotéa *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015), para brindarle un mejor desplazamiento hidrodinámico; otras de las modificaciones que ocurren durante la maduración son a nivel de las mitocondrias, fibras y componentes microtubulares de las piezas media y principal, con la finalidad de dar lugar a la eficiencia en la movilidad progresiva. Todos estos cambios en el espermatozoide previenen en el eyaculado la presencia de células germinales con una carga genética anormal, incompleta o dañada, y evita la presencia de células infértiles que pudieran limitar el éxito reproductivo (Cooper y Yeung, 2006; Arrotéa *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015; Rodríguez-Tobón, 2016).

3.2 Cambios fisiológicos

La funcionalidad óptima de los espermatozoides depende tanto de los procesos que ocurren en el interior como en el exterior de estas células, para lo cual es de gran importancia la formación de diversos microambientes a lo largo del epidídimo, por diferentes moléculas secretadas hacia la luz del túbulo y, asimismo, por los cambios entre las asociaciones celulares que se observan a lo largo del epitelio epididimario, lo que permite que ocurran variaciones en las características y la composición de la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides, lo que les otorga la capacidad de prolongar su supervivencia dentro del tracto genital femenino por el mantenimiento de las membranas acrosomales y plasmática como estructuras estables, al ocurrir los eventos de glicosilación en los componentes de la superficie del espermatozoide y hasta que se produzcan modificaciones que lleven a la reacción acrosomal. La combinación adecuada de los cambios fisiológicos y su vínculo con los morfológicos y bioquímicos

favorece que en los espermatozoides ocurran los procesos ligados con la capacidad fertilizante, como pueden ser: a) la adquisición de un marcado incremento en el vigor de la movilidad, tras el paso del movimiento circular a rectilíneo, b) la capacidad de experimentar el proceso de capacitación y c) la competencia para interactuar con la zona pelúcida y finalmente lograr la fertilización del ovocito (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

3.3 Cambios bioquímicos

Todos los componentes del espermatozoide están rodeados por una membrana plasmática altamente compleja y muy especializada (Srivastava y Olson, 1991; Dacheux y Dacheux, 2014), la cual es un componente vital y de gran importancia para los eventos tempranos que se registran durante la fertilización, empero, el espermatozoide es una célula que pierde la capacidad de sintetizar proteínas o algún otro tipo de molécula de relevancia biológica en los últimos pasos de la espermatogénesis (Dacheux y Dacheux, 2014), por esta razón es que los cambios bioquímicos que se presentan en los gametos masculinos durante todo el recorrido por el epidídimo dependerán de las transformaciones postraduccionales (que se producen en los residuos de los aminoácidos que constituyen a las proteínas), las cuales pueden ser de varios tipos: de adición o de eliminación de grupos funcionales, o por la formación de enlaces con otras proteínas.

Dentro de las transformaciones de gran trascendencia que acontecen en la membrana plasmática de los espermatozoides están diversos cambios que permiten una mejor y específica distribución espacial en los componentes del glicocálix, denominado de esta forma por estar integrado por la presencia de abundantes oligosacáridos, los cuales se han unido a una gran cantidad de proteínas (Rodríguez-Tobón, 2016) y de lípidos, formando cadenas de glicoproteínas y de glicolípidos, respectivamente. Ambas cadenas forman a la cubierta celular que está en contacto con el medio extracelular. De forma particular, en la glicosilación ocurren modificaciones que permiten

la integración o separación de una o más cadenas de glicanos a una cadena principal por medio de enlaces covalentes.

Los cambios bioquímicos que suceden en las porciones de los carbohidratos de los componentes de la membrana plasmática de los espermatozoides durante su maduración en el epidídimo se han evaluado desde hace tiempo, pues se sabe que el contenido de glicoconjugados en los espermatozoides es un buen indicador de la maduración que éstos deben presentar a través de su recorrido por el epidídimo (Tajiri *et al.*, 2012). Debido a que los glicoconjugados son una forma altamente compleja que participa en el reconocimiento célula a célula, en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida en la reacción acrosomal y en la fusión espermatozoide-ovocito (Cardona-Maya y Cadavid, 2005), se requiere del uso de lectinas para evaluar la presencia de estos carbohidratos en la superficie de la membrana del espermatozoide (Srivastava y Olson, 1991).

Las lectinas son proteínas de origen vegetal y animal con una elevada especificidad de unión a los residuos de los carbohidratos, en los glicoconjugados (Hernández-Cruz *et al.*, 2005) funcionan como una herramienta para el análisis de las variaciones en la distribución y densidad de la exposición de los sacáridos cuando el espermatozoide pasa a través del epidídimo, y a pesar de que ciertos detalles de estos cambios no han sido del todo esclarecidos, existe la evidencia de la participación de dos conjuntos de enzimas: a) las glicosiltransferasas, un grupo de enzimas sintéticas que adicionan residuos de azúcares a un azúcar donante (azúcar de nucleótido), y b) las glicohidrolasas, enzimas hidrolíticas que separan residuos de un azúcar de los glicoconjugados ya existentes, ambos grupos se hayan presentes en altas concentraciones en el fluido luminal del epidídimo que rodea a los espermatozoides, el cual favorece modificaciones en los glicoconjugados de la superficie espermática (Tulsiani, 2006).

Entre los azúcares identificados en la membrana del espermatozoide y cuya presencia se modifica con el transporte de estas células por el túbulo del epidídimo, están: a) ácido siálico, que se ha relacionado con la carga

negativa total de la superficie del espermatozoide y que aumenta durante el tránsito epididimal; en el caso de la rata, diversos investigadores han reportado que es en la cabeza de los espermatozoides donde se tienen más altos valores de uniones de ácido siálico a la membrana y conforme avanzan a través del túbulo epididimario disminuyen a valores más bajos las uniones en la cola del espermatozoide, por lo que es posible que la unión de ácido siálico a la membrana pueda ser relevante y estar vinculada con la maduración espermática en esa especie (Hall y Killian, 1987) y como una preparación para la posterior fusión del espermatozoide con el ovocito;

b) N-acetilglucosamina: la adecuada presencia y distribución de este carbohidrato tiene gran importancia en el proceso de interacción entre gametos, además de que en los espermatozoides de algunas especies de mamíferos se ha descrito que la presencia de N-acetilglucosamina es necesaria para que pueda llevar a cabo la reacción acrosomal y eventualmente también la fertilización (Cardona-Maya y Cadavid, 2005; Tulsiani y Abou-Haila, 2012); la presencia de ambos carbohidratos se puede evaluar mediante la afinidad que tienen con la lectina de *Triticum vulgare agglutinina* (WGA), la cual detecta a los residuos encontrados en los glicanos; c) manosa es un carbohidrato que conforma permanentemente la superficie de la membrana de los espermatozoides (Aliabadi *et al.*, 2013), con sus respectivos cambios a lo largo del epidídimo, tiene importancia por participar en el reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida y por estar implicado en el proceso de fertilización (Jiménez *et al.*, 2006; Aliabadi *et al.*, 2013); se ha reportado que la lectina *Canavalia ensiformis agglutinina* (Concanavalina A, Con A) se une a residuos de manosa, lo que hace posible identificar su presencia en la superficie espermática; d) fucosa es un carbohidrato que tiene relación con la unión especie-específica entre gametos, mediante su adherencia con proteínas de la zona pelúcida (Tulsiani y Abou-Haila, 2012) la presencia de fucosa unida a proteínas del espermatozoide y en el plasma seminal otorga la capacidad a los gametos de formar una reserva espermática en el oviducto, tras sumarse a proteínas del epitelio celular que reconocen a

la fucosa (Ignotz *et al.*, 2001). De forma particular, se reportó en el estudio de Hall y Killian (1987) que en los espermatozoides de la rata albina que transitan por el epidídimo la presencia de fucosa en membrana plasmática disminuye tres veces en la región de la cola, al comparar con espermatozoides de la zona de la cabeza.

Los cambios que ocurren durante el proceso de maduración espermática en la presencia de los carbohidratos de membrana incluyen a otras moléculas, como D-galactosa, que disminuye a medida que la célula avanza a lo largo del epidídimo, mientras que los niveles de N-acetilgalactosamina, por el contrario, son superiores en la membrana de los espermatozoides de la cola que en los de la cabeza del epidídimo. Otros residuos de carbohidratos, como la α -D-glucosa y manosa, se presentan en mayor proporción en las membranas de los espermatozoides de la cabeza y de la cola, pero en muy baja cantidad en las de las células del cuerpo epididimario. En relación con el contenido de manosa en la membrana plasmática, los cambios que se registran en el epidídimo pueden ser un buen indicador de maduración en los espermatozoides (Belmonte *et al.*, 2002).

Por otro lado, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas es otro de los cambios intracelulares importantes en la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide durante la maduración (Filtz *et al.*, 2014), debido a que es considerada como la base molecular esencial para el desarrollo coordinado del movimiento progresivo por parte del flagelo y con la posterior capacitación (hiperactivación) y reacción acrosomal del espermatozoide (Moseley *et al.*, 2005; Mor *et al.*, 2007) en el oviducto de la hembra. Se ha encontrado que el estado de fosforilación de proteínas está regulado por una vía dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y por la actividad enzimática de dos tipos de proteínas: a) cinasas y b) fosfatasas, siendo las primeras las que agregan un grupo fosfato y las segundas las que lo remueven. En virtud de que el espermatozoide es incapaz de sintetizar nuevas proteínas, se puede argumentar que la dependencia a la fosforilación de proteínas es mayor al de otros tipos celulares y se asocia con el proceso de maduración epididimaria

por los eventos de fosforilación y desfosforilación principalmente en proteínas del flagelo, participando en la adquisición de la movilidad y en la capacidad para fertilizar al ovocito, funcionando como un switch on/off. En las ratas se han identificado proteínas de un peso molecular de entre 50-64 y 91-127 kDa que se fosforilan, localizadas a nivel de todo el dominio acrosomal del espermatozoide, y de igual forma a nivel de la pieza media (Rodríguez-Tobón, 2016). En el trabajo de investigación realizado por Lewis y Aitken (2001) se analizó el impacto que tiene la maduración espermática epididimaria en los patrones de fosforilación de tirosinas en espermatozoides de la región de la cabeza y de la cola del epidídimo en la rata Wistar, por medio de inmunohistoquímica, cuyos resultados fueron que: a) en los espermatozoides de la región de la cabeza del epidídimo, el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina que se presentó con mayor frecuencia fue el que se observó en la cabeza de los espermatozoides, mientras que b) en los espermatozoides del área de la cola del epidídimo, el patrón de fosforilación sobresaliente fue el que se advirtió en la parte posterior de los espermatozoides; es decir, que la inmunolocalización que predominó en la mayoría se concentró en la parte del flagelo.

Los múltiples cambios que sufren los espermatozoides cuando recorren las regiones del epidídimo son fundamentales (Tulsiani, 2003; Seligman *et al.*, 2004) y dependen de la especialización del microambiente en cada sección del lumen tubular, mediante la síntesis y secreción de proteínas y moléculas que interactúan con los espermatozoides, y por la eliminación de sustancias por parte de las células que integran al epitelio epididimario, cuya funcionalidad depende de la acción que ejercen los andrógenos (Robaire y Hamzeh, 2011; Robaire y Hinton, 2015).

4. Regulación de la función del epidídimo por andrógenos

Las hormonas esteroideas cumplen diversas funciones a lo largo del desarrollo embrionario y en etapas posteriores al nacimiento (Blok *et al.*, 1992), de

forma particular, en los varones los andrógenos tienen efectos que juegan un papel esencial en la masculinización del feto, en la formación de los órganos reproductores internos y externos (Arrotéia *et al.*, 2012) y en el desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas. La testosterona (T) es el principal andrógeno que circula en el torrente sanguíneo, es sintetizada y posteriormente secretada por las células de Leydig, localizadas en el espacio intersticial de los testículos; esta hormona puede llegar a las células del epidídimo mediante dos rutas distintas: a) mediante los conductos eferentes después de salir de la *rete testis*, donde mayormente se suma a la proteína de unión a andrógenos (ABP), y b) a través de la circulación sanguínea, en la cual la T libre puede entrar en las células por difusión pasiva. La mayor parte que llega hacia las células del túbulo epididimal se transforma por la reducción que origina la enzima esteroide 5α -reductasa a su metabolito más potente, la 5α -dihidrotestosterona (DHT) (Robaire y Hamzeh, 2011; Robaire y Hinton, 2015). Es la DHT el esteroide que se ha determinado como el de mayor poder de acción en el mantenimiento de las funciones del epidídimo, lo cual se logra por medio de su unión con el receptor para andrógenos (RA) (Arrotéia *et al.*, 2012). Éste es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares situado en el cromosoma X, cuyo gen codifica un receptor multidominio que está constituido por cuatro dominios funcionales: 1) un dominio NH_2 -terminal (NTD), encargado de la activación transcripcional, calificado como el más variable entre los receptores nucleares tanto en longitud como en secuencia; 2) un dominio de unión a ADN (DBD), localizado en la parte central de la molécula del RA, es la región más conservada dentro de la familia de los receptores nucleares y es la que se une al ADN; 3) un dominio de unión al ligando (LBD), responsable de la dimerización y activación de la transcripción, este dominio regula la interacción entre el RA y las proteínas de choque térmico e interactúa con el dominio NTD del receptor para estabilizar la unión del andrógeno (Heinlein y Chang, 2002) y 4), una región bisagra no conservada y flexible, encargada de unir a los dominios LBD y DBD y de regular la unión al ADN, la translocación nuclear y la transactivación del RA (Haelens *et al.*, 2007).

En los tejidos diana, la regulación de los efectos androgénicos que tienen el RA ocurren debido a que actúa como un factor de transcripción receptor-ligando, pues una vez que en el citosol el RA se ha unido con la T o DHT, deja de estar inactivado por la separación de las proteínas de choque térmico y se transporta hacia el núcleo de la célula, en donde en forma de un homodímero posteriormente se une a los elementos de respuesta a hormonas, denominados elementos de respuesta a andrógenos específicos (ERAs). En el epidídimo de la rata el RA se inmunolocaliza de manera específica, con mayor intensidad en la región de la cabeza y cuerpo, y menor intensidad en la de la cola, lo que sugiere que su presencia y expresión tienen funciones específicas en el epidídimo (Robaire y Hamzeh, 2011; Robaire y Hinton, 2015) para controlar su adecuado desempeño, por lo que la participación y regulación de los andrógenos en el epidídimo es de vital importancia en relación con una buena maduración y almacenamiento de los espermatozoides.

Aunque la función del epidídimo depende en su mayoría del efecto de los andrógenos, se sabe que no son los únicos esteroides que tienen acción dentro de sus diversas regiones, pues la T también se aromatiza a 17β -estradiol (E_2), por medio de la enzima aromatasa P450 dentro de las células epiteliales epididimarias, en las que se ha identificado la presencia de las formas α y β del receptor para estrógenos ($RE\alpha$ y $RE\beta$), tanto en la región de la cabeza como en otras del epidídimo, y cuya expresión parece ser especie específica. El papel de los estrógenos se ha relacionado con la reabsorción del fluido luminal que ocurre en los conductos eferentes y en el segmento inicial del epidídimo; asimismo, los estrógenos regulan el transporte de fluido a través del conducto y son responsables del incremento en la concentración de espermatozoides cuando llegan a la cabeza del epidídimo. Si bien el epitelio del epidídimo se describe como andrógeno dependiente, los estrógenos también asisten en la diferenciación y en el mantenimiento de la morfología epitelial (Arrotéa *et al.*, 2012), lo que indica que el E_2 cumple con un papel en las funciones

que debe desempeñar el epidídimo con los espermatozoides, es decir, que la fisiología del epidídimo está regulada por andrógenos y estrógenos a partir de la producción y secreción de T, la cual es necesaria para controlar la morfofisiología de células epiteliales y la expresión y secreción de proteínas, además de prevenir la muerte celular, lo que asegura la maduración y almacenamiento de los espermatozoides (O'Hara *et al.*, 2011; Kerkhofs *et al.*, 2012), y el incremento de la fertilidad masculina.

Sin embargo, existe una gran variedad de compuestos en el medio ambiente que afectan directamente a la síntesis y concentración de T en diversas especies, lo que conduce a que ocurran alteraciones en las funciones reguladas por hormonas esteroides, dentro de ellas se puede afectar a las que están involucradas con el desempeño del epidídimo en la maduración de los gametos masculinos por medio de las células epiteliales, debido a que se puede modificar la expresión y la secreción de proteínas relacionadas con la maduración y con el almacenamiento previo a la eyaculación de los espermatozoides, de manera que éste puede ser uno de los factores que incrementa los problemas de fertilidad en el varón.

5. Factores que afectan la fertilidad masculina

Durante los últimos años, el enfoque que han tenido diversas investigaciones se centra en la disminución de la calidad reproductiva masculina, debido a que como resultado de los aspectos que han sido evaluados de la salud y que están ligados con la reproducción del varón se han obtenido consecuencias negativas, por ejemplo, la repercusión ocasionada por la exposición a agentes químicos que se encuentran en el ambiente (Povey y Stocks, 2010). De forma que se ha detectado en el ser humano y en animales experimentales (la mayoría roedores) que los contaminantes arrojados por diversas vías hacia el medio ambiente pueden alterar el adecuado funcionamiento del sistema endocrino y provocar un efecto negativo que modifique la producción

de espermatozoides, así como dañar el funcionamiento de los órganos que integran al aparato reproductor implicados en la adquisición del potencial fertilizante de los espermatozoides, como la próstata, las vesículas seminales y el epidídimo, lo cual puede afectar de esta forma la funcionalidad reproductiva de los machos (Anway *et al.*, 2005; Wong y Cheng, 2011).

De forma general, en los últimos años alrededor de todo el planeta se han incrementado los casos de infertilidad, lo que constituye un serio problema en salud reproductiva para las parejas jóvenes. Específicamente en México, de acuerdo con los datos más recientes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la cifra de parejas con problemas de fertilidad corresponde a un aproximado de 1.5 millones, por lo que se ha mencionado que a una de cada seis en edad reproductiva no le resulta sencillo concebir (INEGI, 2016), es decir, enfrentan algún tipo de infertilidad.

La organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) ha definido clínicamente el concepto de infertilidad como la imposibilidad de lograr un embarazo luego de un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de algún método anticonceptivo (WHO, 2010). De acuerdo con este organismo, un aproximado de 15% de las parejas tiene problemas de fertilidad, por lo que requieren de la asistencia de médicos especialistas, lo que implica un gran costo económico y emocional. Del total de las dificultades de fertilidad, se sabe que 30% de ellas obedecen a dificultades directas en la fisiología reproductiva de las mujeres, un 30% más está relacionado de forma concreta con alteraciones que provocan inconvenientes en los varones, mientras que el 40% sobrante corresponde a una gran variedad de causas, que al ser analizadas competen tanto a varones como a mujeres, razón por la que se ha estimado que el hombre se relaciona con 50% de los motivos que provocan infertilidad en la pareja (Cui *et al.*, 2016).

En los varones, las causas de infertilidad pueden derivar de una gran diversidad de condiciones y en su mayoría coinciden con afectaciones que disminuyen de significativamente la cantidad y la calidad de los parámetros seminales, en términos de la concentración, la movilidad y la vitalidad

de los espermatozoides (Palma y Vinay, 2014). Si bien en una mayoría los problemas que ocasionan infertilidad en los varones están relacionados con patologías que al ser identificadas pueden tratarse, como en los casos del varicocele y del hipogonadismo hipogonadotrópico, en otros más –como en la atrofia testicular y en las malformaciones congénitas genitales– es posible tener un diagnóstico contundente, aunque aún no se puede ofrecer tratamiento específico. A pesar de los avances en investigaciones clínicas que intentan responder a las razones por las cuales algunos hombres no logran tener éxito reproductivo, todavía se desconocen aquellas por las que existe cerca de 34-40% de hombres con problemas de fertilidad, de ahí que se les ha agrupado dentro de la infertilidad idiopática, cuya etiología se ignora (Povey y Stocks, 2010; Arrotéia *et al.*, 2012).

Entre los contaminantes dispersos en el medio ambiente que afectan la fertilidad varonil están los metales pesados, los cuales perturban la fisiología reproductiva de diferentes maneras, algunos de éstos son el plomo (Pb), el mercurio (Hg) y el cadmio (Cd) (Wijesekara *et al.*, 2015), elementos químicos que llegan a estar de forma constante, principalmente como consecuencia de las diversas actividades antropogénicas, en nuestro entorno, ya que el Cd se emplea comúnmente para proteger contra la corrosión de metales como el hierro y el acero, sales como el sulfito y el selenito de Cd forman parte de pinturas para colorear cerámicas y plásticos, asimismo, el Cd se utiliza en la fabricación de baterías de hidróxido de níquel-Cd para la industria automotriz, además de que está presente en fertilizantes fosforados y pesticidas utilizados en la agricultura (Cichy *et al.*, 2014) e incluso los compuestos de Cd se vierten al agua de los ríos y lagos, por lo que puede llegar a los alimentos a través del riego y bioacumularse, dado que no es expulsado de los organismos (Tbeileh *et al.*, 2007; Saeed, 2013), de ahí que se reporten altas concentraciones en peces y otras especies marinas de consumo humano. El humo del cigarro es otra causa importante de exposición al Cd, para fumadores activos y pasivos (Ashraf, 2012); la población en general entra en contacto con él a través de diferentes vías,

entre ellas el agua potable, los alimentos y el aire, además en diversas áreas de trabajo industrial (Siu *et al.*, 2009). Es por ello que se ha tratado de legislar a nivel nacional mediante la NOM-009-SSA1-1993 y en otros países como Estados Unidos, mediante el programa nacional de toxicología de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2012), el cual establece que las concentraciones de Cd a las que el ser humano puede exponerse son de 0.25 a 0.50 ppm (correspondientes a 0.25 y 0.5 mg de Cd por litro de agua); sin embargo, en zonas contaminadas, las concentraciones de este metal son más elevadas, por lo que se requiere de un continuo análisis del efecto que puede ocasionar en la salud y fisiología de los individuos.

6. Alteraciones en la fertilidad masculina por efecto del Cd

El Cd, al igual que otros metales pesados, no tiene una función fisiológica en los organismos, no obstante, puede incorporarse al cuerpo mediante alguna de las vías de absorción, debido a que tiene similitud con elementos esenciales como el calcio y el zinc, en cuyos procesos fisiológicos puede intervenir y afectar la regulación del metabolismo (Staessen *et al.*, 1991; Yang y Shu, 2015). Una vez bioacumulado dentro del organismo, el Cd se elimina con mucha dificultad por medio de la orina, debido a que se une estrechamente a metalotioneínas que son completamente reabsorbidas en los túbulos renales; al no tener el Cd alguna participación en resultados benéficos en el cuerpo se bioacumula, alcanzando una vida media de entre 20 a 40 años dentro del organismo (ATSDR, 2012; Ronchetti *et al.*, 2013). Por esta razón se ha reportado que la intoxicación por Cd causa graves daños a nivel celular en órganos vitales como el cerebro, el hígado, el riñón y los huesos, además de que se ha clasificado como cancerígeno (ATSDR, 2012).

La exposición postnatal a Cd acarrea graves consecuencias en el desarrollo sexual masculino, debido a que el eje de regulación neuroendocrina

hipotálamo-hipófisis-testículo es blanco del efecto tóxico que provoca, lo que da origen a secuelas indeseables a nivel de sus tres componentes. De forma particular, en testículos de animales expuestos a este metal antes de la pubertad se ha observado que presentan una reducción en el desarrollo del epitelio seminífero y de la concentración de T, debido a que dentro del testículo el Cd disminuye la actividad de las enzimas esteroidogénicas: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Ji *et al.*, 2010; Lafuente, 2013), que son clave en la transformación del colesterol para la biosíntesis de T, aunado a que el Cd también reduce de forma significativa el número de las células de Leydig (Ji *et al.*, 2010), en las que ocurre la síntesis del andrógeno. La intoxicación por Cd y la desregulación en la síntesis y concentración de T altera la espermatogénesis (Järup y Akesson, 2009; Lafuente, 2013) y causa disminución en la motivación y ejecución sexual, en comparación con individuos sanos (Arteaga-Silva *et al.*, 2015). A la par, el Cd afecta a los órganos andrógeno-dependientes, como el epidídimo, cuyo tamaño y peso reduce.

No obstante, es poco lo que se conoce en cuanto a las alteraciones que produce el Cd en los diferentes cambios de los espermatozoides como parte de su proceso de maduración para adquirir el potencial fertilizante. Así, los daños de este metal en algún proceso bioquímico y/o morfológico pueden dar lugar a una deficiencia fisiológica en los espermatozoides que no permita el éxito reproductivo del macho. La mayor parte de las investigaciones al respecto se han realizado en muestras de eyaculados de humanos y de roedores, y se ha indicado una disminución en la concentración, movilidad y vitalidad espermática (Järup, 2003; Haouem *et al.*, 2008; ATSDR, 2012).

En pacientes con infertilidad se ha determinado que la presencia de Cd en la sangre tiene correlación inversa con la concentración espermática en el eyaculado, esto es, aminora el número de espermatozoides conforme incrementa la bioacumulación de Cd, y lo mismo ocurre con los parámetros de movilidad, pues los porcentajes se reducen (Benoff *et al.*, 2009), por estas razones es que se ha afirmado que la bioacumulación en el aparato reproductor

masculino y su presencia en el semen interviene en la reproducción de los varones y favorece el incremento de infertilidad masculina, al reducir la calidad espermática (Pant *et al.*, 2003). Lo anterior se suma al hecho de que eleva el porcentaje de anormalidades morfológicas en los espermatozoides, las cuales participan en la ejecución del movimiento progresivo, en el reconocimiento y en la posterior fertilización del ovocito, incluso se ha demostrado que el Cd puede ocasionar la reacción acrosomal de forma prematura (Oliveira *et al.*, 2009). El referido elemento genera mecanismos pro-oxidantes que incentivan el desbalance en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales producen un aumento en la lipoperoxidación de las membranas, lo que en el caso de los espermatozoides de varones expuestos a Cd se ha comprobado y se ha correlacionado con la azoospermia, debido a que el Cd tiene un efecto adverso durante la espermatogénesis (Akinloye *et al.*, 2006). A nivel del núcleo y de la información genética que se resguarda en el espermatozoide, se ha reportado que puede causar diversos daños al ADN (Xu *et al.*, 2003; Taha *et al.*, 2013), debido a que hay un incremento en la fragmentación y en la descompactación de esta molécula, por lo que parte de la información almacenada en los ácidos nucleicos se puede perder. Es por los anteriores antecedentes que se ha propuesto como necesario seguir investigando con mayor detalle los efectos del Cd en el epidídimo, ya que puede ser que por la exposición *per se* haya una alteración en el desempeño del mismo, o que sea una consecuencia de la reducción en la concentración de T la que afecte a la expresión y secreción de proteínas relacionadas con la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides, que ocurre como parte de las funciones que cumplen las células epiteliales que los rodean.

7. Efecto del Cd en el epidídimo y en espermatozoides durante su maduración

Los estudios que reportan efectos del Cd sobre la función epididimaria se centran en los parámetros de calidad espermática en muestras de

eyaculados, tanto de humanos como de roedores. En dichas investigaciones se ha demostrado que a causa del Cd se registra una baja concentración de espermatozoides y en el porcentaje de los vivos (Järup, 2003; Haouem *et al.*, 2008; ATSDR, 2012). También se sabe que el Cd ocasiona un alto número de anomalías morfológicas a lo largo de todo el espermatozoide que afectan el movimiento progresivo y que posteriormente limitan el reconocimiento y fertilización del ovocito, aunado a que el Cd causa daño en el ADN de los espermatozoides (Taha *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013), a través de ERO, que puede modificar la estructura e integridad de las membranas, lo que se ha relacionado con azoospermia en varones infértiles (Akinloye *et al.*, 2006). Otro de los efectos negativos al ADN es la descompactación de la cromatina espermática por la pérdida de las uniones en los puentes disulfuro (S-S) entre los residuos de cisteína que unen a las protaminas y juntos estabilizan la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática (Quintero-Vásquez *et al.*, 2015), por lo que estas alteraciones también se han asociado con la infertilidad. Sin embargo, en estudios con exposición de espermatozoides a CdCl_2 *in vitro*, se ha reportado que no tiene un impacto sobre la integridad de la cromatina espermática, pero sí sobre la fragmentación del ADN espermático (Méndez *et al.*, 2011).

En un estudio llevado a cabo por Ribeiro (2013) en ratas Wistar para ver el efecto del Cd en la función epididimaria, tras la administración en una sola dosis a diferentes concentraciones de CdCl_2 (1.1, 1.4 y 1.8 mg/kg) se observó que entre mayor es la cantidad hay una menor presencia de espermatozoides en el lumen del túbulo de la región del segmento inicial, la cabeza y la cola del epidídimo. En este mismo estudio se evaluó el diámetro del epitelio y la luz del túbulo, encontrándose un aumento en el espesor del epitelio de la cabeza del epidídimo de los animales tratados con 1.1 y 1.4 mg/kg de Cd, por lo que se sugirió que este efecto se debe a una incapacidad en la reabsorción del fluido luminal. Respecto de la luz del túbulo, se advirtió que en la región de la cola del epidídimo de los animales tratados con 1.8 mg/kg de Cd hay una mayor proporción en el diámetro de la luz y una disminución

en el número de espermatozoides presentes; en datos similares reportados se indica que la exposición a Cd disminuye la concentración espermática en las tres regiones del epidídimo y que lo mismo ocurre al examinar la movilidad (Benoff *et al.*, 2009). Se ha documentado que estos resultados se pueden deber a que el Cd tiene un efecto negativo sobre la regulación y el mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria (Dubé y Cyr, 2012), lo que ocasiona cambios en la histología del epidídimo, incluyendo en el grosor del epitelio, necrosis de las células epiteliales, vasoconstricción y edema intersticial junto con la infiltración de células mononucleares, lo que desemboca en la alteración del proceso de maduración espermática, que puede interferir y causar con ello infertilidad (Adamkovicova *et al.*, 2014).

A pesar de que los estudios antes mencionados analizan los efectos del Cd sobre parámetros de calidad espermática y algunas características histológicas, falta considerar lo que corresponde a los cambios bioquímicos propios de la maduración epididimaria, como la glicosilación de la membrana de los espermatozoides que involucra azúcares como N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa y la fucosa, así como la acción del Cd en los procesos relacionados con la adquisición de la movilidad espermática, como es el caso de la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas de espermatozoides.

7.1 Efecto del Cd en la glicosilación de membrana espermática

De la realización adecuada y ordenada de los eventos de glicosilación que ocurren a nivel de la membrana plasmática durante la maduración epididimaria, depende el desarrollo de la capacidad del espermatozoide para atravesar las mucosas cervicales, acercarse al ovocito y fertilizarlo. Sin embargo, no existen trabajos de investigación que analicen con amplitud el impacto que puede tener el Cd en estos procesos bioquímicos, aunque de forma general es posible señalar que sí son afectados según se describe a continuación.

Como ya se mencionó previamente, la N-acetilglucosamina es un carbohidrato presente en la membrana plasmática del espermatozoide que cambia a lo largo del túbulo epididimario, por lo que se ha sugerido que estas modificaciones están relacionadas con la maduración espermática (Hall y Killian, 1987). Tulsiani (2006) indagó que la unión de N-acetilglucosamina a residuos de glicoconjugados se realiza por medio de la actividad de la enzima N-acetilglucosamiltransferasa, aunque no existe del todo un patrón bien diferenciado de su actividad; la descripción señala que en la región distal de la cabeza del epidídimo hacia la proximal de la cola (cercanas al cuerpo del epidídimo), la actividad de esta enzima es mayor sobre los espermatozoides (Tulsiani, 2006); acerca del efecto que el Cd puede tener sobre la actividad de enzimas de glicosilación como N-acetilglucosaminidasa, se ha evaluado *in vitro* en espermatozoides de eyaculado de carpa y no se han encontrado diferencias significativas entre las distintas concentraciones de Cd (1, 10 y 100 mg/L) y a diferentes tiempos de incubación (0, 4 y 24 horas), respecto de los espermatozoides del grupo control (Sarosiek *et al.*, 2009). No obstante, en el análisis de nuestro equipo de trabajo hemos observado que la exposición *in vivo* a Cd disminuye la presencia de N-acetilglucosamina en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de ratas Wistar expuestas a este tóxico, a diferencia de los espermatozoides de cada una de las mismas regiones del epidídimo de nuestro grupo control; esto se pudo visualizar por medio de la unión específica que tiene este carbohidrato con la lectina de *Triticum vulgare*, o aglutinina del germen de trigo (Wheat germ agglutinin, WGA), proteína que de igual forma puede reconocer a residuos de ácido siálico, un carbohidrato cuya presencia en los tejidos de la carpa (riñón, hígado, músculo y branquias) disminuye como resultado de la exposición a Cd (Aktaş *et al.*, 2010); sin embargo, hasta el momento no se había descrito con exactitud si el Cd pudiera afectar la presencia del ácido siálico en los espermatozoides que transitan a lo largo del epidídimo, de ahí que en nuestro grupo de trabajo analizamos la presencia y las modificaciones

de este carbohidrato a nivel de membrana plasmática conforme avanzaba a lo largo del epidídimo, a fin de descifrar de qué manera se pudiera estar dañando la maduración epididimaria en espermatozoides de ratas Wistar expuestas a una dosis de 0.25 mg/Kg de CdCl_2 . Nuestros resultados apuntan a que siempre hubo una baja presencia de ácido siálico en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo, respecto de los espermatozoides correspondientes a cada región de estudio del grupo control; no obstante, aún es necesario saber si esto se debe a un efecto directo del Cd sobre los sitios de unión entre el ácido siálico con sus glicoconjugados o si se debe a que el Cd puede estar afectando *per se* la actividad de la enzima sialiltransferasa, la cual de manera normal es alta en la región de la cabeza del epidídimo y disminuye significativamente hacia la zona de la cola (Tulsiani, 2006). Asimismo, otra causa por la cual el Cd puede alterar la presencia de ácido siálico en los espermatozoides es que su efecto tóxico sobre el epitelio epididimario es capaz de dañar la secreción de este carbohidrato, pues se ha documentado que en condiciones normales es un evento que debe ocurrir en el epidídimo (Toshimori *et al.*, 1988).

El papel que tiene la exposición a Cd sobre la presencia de otros carbohidratos en la membrana plasmática del espermatozoide cuando transitan por el epidídimo es un proceso desconocido, como en el caso de la adición de la manosa y la fucosa en la membrana.

Acerca de la manosa se ha descrito que es un carbohidrato localizado en la membrana de los espermatozoides (Jiménez *et al.*, 2006; Aliabadi *et al.*, 2013), con función activa en la reacción acrosomal (Wu y Sampson, 2013) y que tiene gran relevancia en la señalización de procesos posteriores, como en la fertilización del ovocito (Belmonte *et al.*, 2002). Por tal motivo, en la investigación que realizamos se evaluó su presencia mediante su unión a la lectina de *Canavalia ensiformis agglutina* (Concanavalina A, Con A) en espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de ratas Wistar con tratamiento de CdCl_2 . Se encontraron porcentajes bajos de manosa en el área del glicocáliz de los espermatozoides *versus* un alto porcentaje de

espermatozoides sin presencia de este carbohidrato en la misma región en las ratas administradas con Cd, resultados que fueron significativamente opuestos a los obtenidos en los espermatozoides de ratas empleadas como grupo control, por lo que consideramos que dichas variaciones en presencia de manosa en los espermatozoides son ocasionadas por el Cd y pueden repercutir tanto en el proceso de maduración como en la capacitación y fertilización, de tal forma que el Cd podría afectar el potencial fertilizante de los espermatozoides.

Otro interés en nuestro grupo de trabajo fue investigar si el Cd generaba alguna alteración en la fucosa presente en los espermatozoides de ratas Wistar expuestas a este metal pesado, pues a la fecha no se ha descrito algo al respecto; sin embargo, es importante mencionar que cualquier tipo de modificación en la presencia y en el orden en que se integre fucosa al glicocáliz del espermatozoide, puede ocasionar problemas de fertilidad masculina (Tecle y Gagneux, 2015). Del análisis que se efectuó con el uso de la lectina *Ulex europaeus agglutinina* (UEA), que es una proteína afín a los residuos de fucosa, obtuvimos que en los espermatozoides de ratas con administración de CdCl_2 se tenía un patrón opuesto al de los del grupo control, es decir, se detectó un bajo porcentaje en la presencia de este carbohidrato en espermatozoides de la cabeza del epidídimo y fue aumentando hacia la región de la cola, mientras que en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo de ratas control se tenía un gran porcentaje de fucosa, que posteriormente disminuía hacia la cola del epidídimo. Cabe mencionar que en el trabajo de investigación de Tulsiani (2006) se indica que la integración de fucosa hacia la membrana plasmática de los espermatozoides la lleva cabo la enzima fucosiltransferasa, la cual tiene una alta actividad en la cabeza y se reduce hacia la cola del epidídimo, por lo que el Cd podría afectar la síntesis y función de esta enzima, que se regula a partir del epitelio epididimario y por lo tanto ser una de las causas en las diferencias observadas en espermatozoides del grupo tratado con Cd.

8. Efecto del Cd en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas durante la maduración espermática

Se ha considerado a la fosforilación de tirosinas como uno de los cambios intracelulares más importantes que ocurren en el espermatozoide durante la maduración epididimaria, debido a que se ha tomado como la base molecular esencial para el desarrollo coordinado del movimiento progresivo, la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide en el oviducto de la hembra, por lo que las alteraciones que genera en este proceso la exposición a Cd pueden ser causa principal en la infertilidad masculina.

Una de las modificaciones que ocasiona el Cd durante los eventos de fosforilación es que afecta la actividad de las tirosincinasas (enzimas con la capacidad de transferir un grupo fosfato a un residuo de tirosina de una proteína), o a los sitios de unión de las proteínas sustrato, por lo que se ha tomado a esta circunstancia como una explicación a los estudios que señalan que tanto en animales como en seres humanos con exposición a Cd se presentan alteraciones en la movilidad espermática (Da Costa *et al.*, 2016). Por otra parte, también se ha descrito que las fallas en la movilidad espermática como consecuencia del Cd pueden deberse a un desgaste energético y a una disminución de la concentración de ATP/AMP, pues el estado de fosforilación está regulado por una vía dependiente de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), lo que influye sobre la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas.

De acuerdo con el estudio *in vitro* de Wang *et al.* (2016), en el que observaron el efecto del Cd (usando diferentes concentraciones: 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 μM , en un medio basal) en la fosforilación de proteínas en espermatozoides de la cola del epidídimo de ratón, se determinó que incrementaba el porcentaje de proteínas fosforiladas en espermatozoides con exposición a CdCl_2 , comparados con el grupo control, al que no se le administró Cd. Empero, señalan que el aumento de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina no es un hecho que pueda favorecer en todas las especies el desarrollo de la movilidad de los espermatozoides, debido a que cuando analizaron los

parámetros de movilidad espermática, salvo el de inmóviles, los demás se presentaron anulados.

Particularmente, en la investigación que se llevó a cabo en nuestro equipo de trabajo, se observó que una concentración de 0.25 mg/Kg de CdCl_2 por vía intraperitoneal también provoca un incremento de proteínas que se fosforilan, pues se tuvo un aumento progresivo de este proceso en espermatozoides de la región de la cabeza al cuerpo del epidídimo, y posteriormente fue mayor en aquellos de la región de la cola de sujetos tratados con Cd, lo cual fue distinto a lo encontrado en espermatozoides de sujetos control, cuyo patrón de fosforilación de proteínas era similar entre las áreas de la cabeza y el cuerpo del epidídimo, y disminuían notablemente en la región de la cola.

9. Conclusión

La información reunida en los diversos estudios que se consultaron en este capítulo señala que la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides depende de la correcta funcionalidad del epidídimo y de los distintos cambios que propicia sobre los espermatozoides, en tiempo y espacio, a lo largo del mismo. Sin embargo, las alteraciones que genera el Cd sobre el epitelio y funciones del epidídimo modifican los cambios requeridos para la maduración, de manera que se afecta la adición de carbohidratos de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina de los espermatozoides en las tres regiones del epidídimo. Así, la exposición a Cd puede perturbar la maduración espermática epididimaria y ser una de las causas de las diversas fallas en inhibición en la movilidad y con ello propiciar el aumento de problemas al momento de la fertilización del ovocito, incrementando los casos de infertilidad masculina en la actualidad.



Figura 1. Organización esquemática del epidídimo de rata. Las cuatro regiones del epidídimo, cabeza, cuerpo y cola están representadas, así como el segmento inicial. Las líneas indican el sitio donde se dividen las diferentes regiones (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

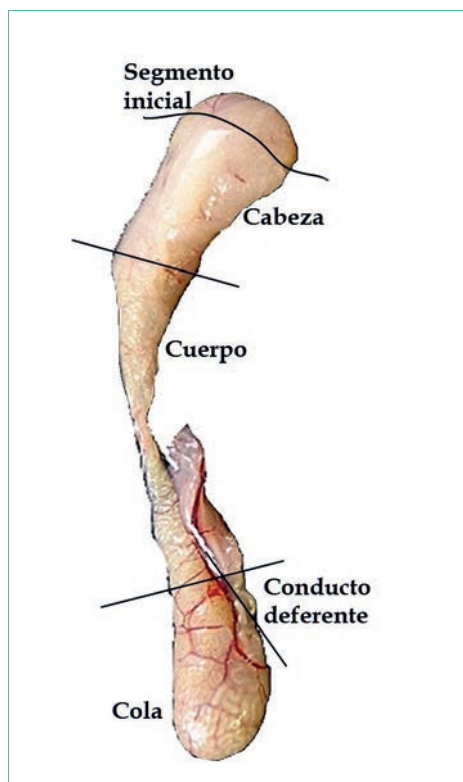
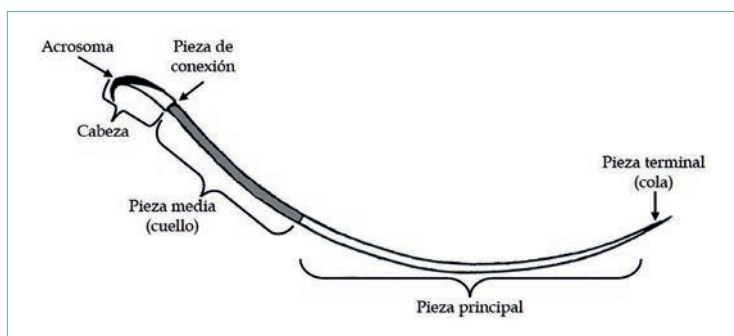


Figura 2. Estructura anatómica del espermatozoide de la rata.



Referencias

- Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V. y Duranova, H. (2014). Effects of subchronic exposure to cadmium and diazinon on testis and epididymis in rats. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-9.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012). Toxicological profile for cadmium. *Division of Toxicology and Human Health Sciences, Environmental Toxicology Branch*. Atlanta: autor.
- Akinloye, O., Arowojolu, A.O., Shittu, O.B. y Anetor, J.I. (2006). Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive Biology*, 6(1), 17-30.
- Aktaş, T., Bakar, E. y Güner, U. (2010). The effects of short-term exposure to cadmium and copper on sialic acid in carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(3), 432-437.
- Aliabadi, E., Karimi, F. y Talaei-Khozani, T. (2013). Effects of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(2), 107-115.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. y Skinner, M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male infertility. *Science*, 308(5727), 1466-1469.
- Archana Srivastava, A. y Olson, G.E. (1991). Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 29(4), 357-364.
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A. y Rosado-García, A. (2012). Espermatogénesis, maduración y almacenamiento epididimario de espermatozoides en mamíferos. En S. Retana-Márquez (comp.), *Avances en la Biología de la Reproducción* (pp. 12-42). Ciudad de México: UAM-SEP.
- Arrotéia, K.F., Vianna-García, P., Ferreira-Barbieri, M., Lopes-Justino, M. y Violin-Pereira, L.A. (2012). The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. En L. Violin-Pereira (ed.), *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics* (pp. 41-66). Croacia: InTech. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlights-on-classic-topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-infertility>
- Arteaga-Silva, M., Mendoza-Mendoza, T.N., Hernández-Rodríguez, J., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Limón-Morales, O., Bonilla-Jaime, H. y Vázquez Palacios, G. (2015). La exposición postnatal al cadmio disminuye los niveles de testosterona y provoca un déficit de la motivación y ejecución sexual en ratas macho adultas. En A. Sanz-Martin, M.E. Olvera-Cortés, M. Hernández González y M.A. Guevara Pérez (eds.), *Neurodesarrollo de la cognición y la conducta* (pp. 69-104). Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.

- Ashraf, M.W. (2012). Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. *The Scientific World Journal*, 2012. 1-5. doi: 10.1100/2012/729430
- Belmonte, S.A., Romano, P.S. y Sosa, M.A. (2002). Mannose-6-phosphate receptors as a molecular indicator of maturation of epididymal sperm. *Archives of Andrology*, 48(1), 53-63.
- Benoff, S., Hauser, R., Marmar, J.L., Hurley, I.R., Napolitano, B. y Centola, G.M. (2009). Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Molecular Medicine*, 15(7-8), 248-262.
- Blok, L.J., Bartlett, J.M., Bolt-De Vries, J., Themmen, A.P., Brinkmann, A.O., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. y Grootegoed, J.A. (1992). Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. *International Journal of Andrology*, 15(2), 182-198.
- Caballero, J., Frenette, G. y Sullivan, R. (2011). Post Testicular Sperm Maturation Changes in the Bull: Important Role of the Epididymosomes and Protasomes. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1-13. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/757194>
- Cardona-Maya, W.D. y Cadavid, A.P. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 29(7), 676-684.
- Cichy, B., Jaroszek, H. y Pasezek, A. (2014). Cadmium in phosphate fertilizers; ecological and economical aspects. *CHEMIK*, 68(10), 837-842.
- Cooper, T.G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, 20(1), 9-11.
- Cooper, T.G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 130-138.
- Cooper, T.G. y Yeung, C.H. (2006). Sperm maturation in the human epididymis. En C.J. De Jonge y C.L.R. Barratt (eds.), *The sperm cell* (pp. 72-107). N.Y.: Cambridge University Press.
- Cornwall, G.A., von Horsten, H.H., Swartz, D., Johnson, S., Chau, K. y Whelly, S. (2007). Extracellular quality control in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 500-507.
- Cui, X., Jing, X., Wu, X. y Yan, M. (2016). Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4659-4665.
- Da Costa, R., Botana, D., Piñero, S., Proverbio, F. y Marín, R. (2016). Cadmium inhibits motility, activities of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and axonemal dynein-ATPase of human spermatozoa. *Andrologia*, 48(4), 464-469.
- Dacheux, J.L. y Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2), 27-42.
- Dacheux, J.L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L. y Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1-2), 45-50.
- Dubé, E. y Cyr, D.G. (2012). The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 763(2013), 218-236.

- Filtz, M.T., Vogel, W.K. y Leid, M. (2014). Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 76-85.
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L. y Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Research*, 67(9), 4514-4523.
- Hall, J.C. y Killian, G.J. (1987). Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biology of Reproduction*, 36(3), 709-718.
- Haoem, S., Najjar, M.F., Hani, A.E. y Sakly, R. (2008). Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(5), 307-311.
- Heinlein, C.A. y Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Society*, 23(2), 175-200.
- Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B. y Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*, 24(1), 21-27.
- Hernández-Rodríguez, J., Togno-Peirce, C., López de Jesús, P., Pérez-Aguirre, S.G., Arenas-Ríos, E., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Bonilla-Jaime, H., Damián-Matzumura, P. y Arteaga-Silva, M. (2016). Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 11-21.
- Hess, R.A. y Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636(1), 1-15.
- Ignatz, G.G., Lo, M.C., Pérez, C.L., Gwathmey, T.M. y Suárez, S.S. (2001). Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1806-1811.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2016). *Temas estadísticos*. Recuperado de www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182.
- Järup, L. y Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 201-208.
- Jenardhanan, P., Panneerselvam, M. y Mathur, P.P. (2016). Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59(2016), 126-140.
- Ji, Y.L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X.F., Meng, X.H., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y. y Xu, D.X. (2010). Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 176-183.
- Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, G., Romo, S. y Betancourt, M. (2006). Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and n-acetylglucosamine/sialic acid residues. *Archives of Andrology*, 52(6), 455-462.

- Kerkhofs, S., Dubois, V., De Gendt, K., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Schuit, F., Boonen, S., Vanderschueren, D., Saunders, P.T.K., Verhoeven, G. y Claessens, F. (2012). A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 reductase II gene. *The FASEB Journal*, 26(10), 4360-4372.
- Lafuente, A. (2013). The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 59(2013), 395-404.
- Lewis, B. y Aitken, R.J. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1545-1556.
- Méndez, Y., Báez, F. y Villamediana, P. (2011). Efecto de la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a cadmio (CdCl_2). *Perinatología y Reproducción Humana*, 25(4), 198-204.
- Mor, V., Das, T., Bhattacharjee, M. y Chatterjee, T. (2007). Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2), 404-409.
- Moseley, F.L., Jha, K.N., Björndahl, L., Brewis, I.A., Publicover, S.J., Barratt, C.L. y Lefèvre, L. (2005). Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. *Molecular Human Reproduction*, 11(7), 523-529.
- Neto, F.T., Bach, P.V., Najari, B.B., Li, P.S. y Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59(2016), 10-26.
- Nixon, B., Ewen, K.A., Krivanek, K.M., Clulow, J., Kidd, G., Ecroyd, H. y Jones, R.C. (2014). Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction*, 147(3), 265-277.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I. y Stanton, P.G. (2011). Spermiation, The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1(1), 14-35.
- O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P.T.K. y Smith, L.B. (2011). Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology*, 152(2), 718-729.
- Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C. y Pereira, M.L. (2009). Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*, 28(4), 550-555.
- Palma, C.C. y Vinay, J.I. (2014). Infertilidad masculina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(1), 122-128.
- Palomo-Peiró, M.J. (1995). Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación *in vitro* en el caprino. Disertación doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Pant, N., Upadhyay, G., Pandey, S., Mathur, N., Saxena, D.K. y Srivastava, S.P. (2003). Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reproductive Toxicology*, 17(4), 447-450.

- Perobelli, J.E., Patrão, M.T.C.C., Fernandez, C.D.B., Sanabria, M., Klinefelter, G.R., Avellar, M.C.W. y Kempinas, W.D.G. (2013). Androgen deprivation from pre-puberty to peripuberty interferes in proteins expression in pubertal and adult rat epididymis. *Reproductive Toxicology*, 38(2013), 65-71.
- Povey, A.C. y Stocks, S.J. (2010). Epidemiology and trends in male subfertility. *Human Fertility*, 13(4), 182-188.
- Quintero-Vásquez, G.A., Bermúdez-Cruz, R.M. y Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 144-151.
- Ribeiro, S.P. (2013). Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar. (Disertación de maestría). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brasil.
- Robaire, B. y Hamzeh, M. (2011). Androgen Action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 592-599.
- Robaire, B. y Hinton, B.T. (2015). The Epididymis. En T.M. Plant y A.J. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 619-677). USA: Elsevier.
- Rodríguez-Tobón, A. (2016). Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Disertación doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Ronchetti, S.A., Miler, E.A., Duvilanski, B.H. y Cabilla, J.P. (2013). Cadmium mimics estrogen-driven cell proliferation and prolactin secretion from anterior pituitary cells. *PLoS One*, 8(11), 1-13.
- Saeed, B.T. (2013). Effects of cadmium on sperm parameters, histological and hormonal changes in testes of mature rats. *Iraqi Journal. Embryos and Infertility Researches*, 3(6), 45-51.
- Sarosiek, B., Pietruszewicz, M., Radziwoniuk, J. y Głogowski, J. (2009). The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Reproductive biology*, 9(3), 295-301.
- Seligman, J., Zipser, Y. y Kosower, N.S. (2004). Tyrosine Phosphorylation, Thiol Status and Protein Tyrosine Phosphatase in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(3), 1009-1015.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S. y Cheng, C.Y. (2009). "Cadmium-induced testicular injury", *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 238, Núm. 3, pp. 240-249.
- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M. y Stout, T.A.E. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 237-248.
- Srivastava, A. y Olson, G.E. (1991). Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 29(4), 357-364.
- Staessen, J., Amery, A., Bernard, A., Bruaux, P., Buchet, J.P., Claeys, F., De Plaen, P., Ducoffre, G., Fagard, R., lauwerys, R.R., Lijnen, P., Nick, L., Saint Remy, A., Roels, H., Rondia, D., Sartor, F. y Thijs, L. (1991). Effects of exposure to cadmium on calcium metabolism: a population study. *British Journal of Industrial Medicine*, 48(10), 710-714.
- Taha, E.A., Sayed, S.K., Ghandour, N.M., Mahran, A.M., Saleh, M.A., Amin, M.M. y Shamloul, R. (2013). Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Central European Journal of Urology*, 66(1), 84-92.

- Tajiri, S., Fukui, T., Sawaguchi, A. y Yoshinaga, K. (2012). Cell- and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 88(4), 141-146.
- Tbeileh, N., Elbetieha, A., Darmani, H. y Khamas, W. (2007). Effects of long term exposure to cadmium chloride on fertility in adult male mice. *Veterinary Research*, 1(2), 40-48.
- Tecle, E. y Gagneux, P. (2015). Sugar-Coated Sperm: Unraveling the Functions of the Mammalian Sperm Glycocalyx. *Molecular Reproduction & Development*, 2015(82), 635-650.
- Toshimori, K. (1988). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research*, 293(2), 177-187.
- Tulsiani, D.R.P. (2003). Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: Are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microscopy Research and Technique*, 61(2003), 18-27.
- Tulsiani, D.R.P. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(2006), 58-65.
- Tulsiani, D.R.P. y Abou-Haila, A. (2012). Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*, 2012, 1-12.
- Wang, L., Li, Y., Fu, J., Zhen, L., Zhao, N., Yang, Q., Li, S. y Li, X. (2016). Cadmium inhibits mouse sperm motility through inducing tyrosine phosphorylation in a specific subset of proteins. *Reproductive Toxicology*, 63(2016), 96-106.
- Wassarman, P.M., Jovine, L. y Litscher, E.S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, 3(2), E59-E64.
- Wijesekara, G.U.S., Fernando, D.M.S., Wijerathna, S. y Bandara, N. (2015). Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility: A caveat. *Ceylon Medical Journal*, 60(2), 52-56.
- Wong, E.W. y Cheng, C.Y. (2011). Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends pharmacology sciences*, 32(5), 290-299.
- World Health Organization (WHO). (2010). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5a ed. Suiza: autor.
- Wu, L. y Sampson, N.S. (2013). Fucose, Mannose, and β -N-Acetylglucosamine Glycopolymers Initiate the Mouse Sperm Acrosome Reaction through Convergent Signaling Pathways. *ACS Chemical Biology*, 2014(9), 468-475.
- Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E. y Ong, C.N. (2003). The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 155-163.
- Yang, H. y Shu, Y. (2015). Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1484-1494.

Glosario

17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD): enzima con la capacidad de convertir a la estrona en estradiol.

3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD): enzima con la capacidad de sintetizar pregnenolona a progesterona (17-hidroxipregnenolona a 17-hidroxiprogesterona) y dehidroepiandrosterona a androstenediona en la glándula suprarrenal.

5 α -dihidrotestosterona (DHT): metabolito activo de la testosterona con alto poder biológico, debido a que la DHT tiene una afinidad tres veces más alta que la testosterona y 15-30 veces más alta que los andrógenos suprarrenales con el receptor para andrógenos. Es sintetizada por la enzima 5 α -reductasa que disminuye el doble enlace 4,5 de la testosterona. En los hombres, aproximadamente 5% de la testosterona es reducida a DHT. En el desarrollo embrionario, la DHT es fundamental para la formación de los genitales externos masculinos y en el adulto actúa como el andrógeno principal en la próstata y folículos pilosos.

ADN: ácido desoxirribonucleico, una compleja cadena de polímeros que almacenan toda la información genética de un ser vivo.

ADN Acrosoma: estructura en forma de casquete que recubre al núcleo con el ADN, se sitúa

en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide y contiene enzimas hidrolíticas cuya participación es relevante durante el proceso de fecundación.

Bioacumulación: proceso de acumulación de sustancias químicas tóxicas en diferentes tejidos de los organismos vivos, cuyas concentraciones son más altas que las existentes en el medio ambiente o en los alimentos, tras entrar por vía respiratoria, digestiva o cutánea.

Cadmio (Cd): elemento químico cuyo número atómico es el 48 y su símbolo químico es Cd; se encuentra en el grupo 12 de la tabla periódica de los elementos. Es considerado como un metal pesado, por tener una densidad igual o superior a 5 g/ml, pues su peso atómico es de 112.40 g/mol; es un metal suave, color plata-blancuecino que generalmente no se presenta en el ambiente en forma pura, pero forma compuestos con otros elementos como el oxígeno (O) (óxido de cadmio, CdO), cloro (Cl) (cloruro de cadmio, CdCl₂) o azufre (S) (sulfato y sulfuro de cadmio, CdSO₄ y CdS).

Epidídimo: órgano que se divide en cabeza, cuerpo y cola; se compone de un solo tubo estrecho, largo y enrollado, cuya longitud depende del tipo de especie. Está ubicado en la parte superior del testículo y une a los conductos eferentes con el conducto deferente.

Especies reactivas de oxígeno (ERO):

moléculas pequeñas con alto poder reactivo, debido a que tienen una capa de electrones de valencia no apareada, se pueden formar de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, un aumento descontrolado en su concentración puede originar daños significativos en estructuras celulares.

Espermatogénesis: serie ordenada de ambos tipos de división celular (mitosis y meiosis) que junto con la espermiogénesis produce espermatozoides anatómicamente completos a partir de células espermatogonias, con la participación de las células de Sertoli y las células de Leydig en los túbulos seminíferos.

Espermatozoide: célula sexual haploide portadora del material genético masculino, que tiene el potencial de moverse.

Estradiol (E_2 o 17β -estradiol): hormona sexual esteroide que se deriva del colesterol; para su formación, la enzima aromatasa toma a la testosterona como sustrato y la aromatiza. En las mujeres es producido por las células granulosas de los ovarios.

Flagelo: apéndice movable con forma de látigo que se presenta en una gran diversidad de organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares. En los espermatozoides es una estructura necesaria para la movilidad.

Fosforilación: adición de un grupo fosfato a cualquier otra molécula, por

ejemplo, a un aminoácido de una proteína. Éste es el mecanismo básico de transporte de energía desde el sitio en que se produce hasta en donde es requerida. La fosforilación es uno de los mayores procesos que regula la actividad de las proteínas, particularmente de enzimas.

Gametos: del griego *upameetē* “esposa” o *γαμήτης* *gamētēs* “marido”, son células sexuales haploides (n), originadas por mitosis y meiosis a partir de las células germinales. Se nombran de acuerdo con el sexo del portador, ovocito para el femenino y espermatozoide para el masculino; tras su fusión, se da origen a una célula cigoto con dos conjuntos de cromosomas o diploide ($2n$).

Glicocáliz: estructura compuesta por la presencia de abundantes oligosacáridos que están unidos a una gran cantidad de proteínas.

Glicohidrolasas: grupo de enzimas hidrolíticas que separan residuos de un azúcar de los glicoconjugados existentes.

Glicosilación: modificaciones que permiten la integración o separación de una o más cadenas de glicanos a una cadena principal por medio de enlaces covalentes.

Glicosiltransferasas: conjunto de enzimas sintéticas que adicionan residuos de azúcares a un azúcar donante (azúcar de nucleótido).

In vitro: del latín “dentro del vidrio”, término que se emplea para las técnicas que se realizan como parte de un experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

In vivo: del latín “dentro de lo vivo”, término que se emplea para las técnicas que se llevan a cabo dentro de un organismo vivo, como las pruebas realizadas con animales y a los ensayos clínicos.

Infertilidad idiopática: incapacidad con etiología desconocida para lograr un embarazo en un plazo no mayor a un año.

Infertilidad: imposibilidad de lograr un embarazo luego de un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de algún método anticonceptivo.

Lectina: proteína de origen vegetal o animal con la capacidad de unirse con alta especificidad a los residuos de un azúcar específico.

Membrana plasmática: integrada por una bicapa lipídica que engloba y da forma a la célula, está integrada por fosfolípidos, glucolípidos y proteínas. Mantiene el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular), y regula la entrada y salida de diversas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular.

Ovocito: del latín *ovulum*, diminutivo de *ovum* “huevo”, es una célula sexual haploide portadora del material genético femenino, el cual es grande e inmóvil.

Potencial fertilizante: capacidad que adquieren los espermatozoides para moverse progresivamente, reconocer y unirse a la zona pelúcida a fin de fecundar un ovocito.

Puente disulfuro (S-S): enlace covalente fuerte entre grupos tiol (-SH) de dos cisteínas; este tipo de

enlace es de gran relevancia en la estructura, plegamiento y función de las proteínas.

Rete testis: compleja red interconectada que se forma en los extremos de los túbulos seminíferos, se localiza en la parte superior del testículo y actúa como puente de unión con los conductos eferentes.

Testículo: órgano del aparato reproductor masculino que cumple con una doble función: ser una gónada en la que se producen los espermatozoides y una glándula en la que se sintetiza y secretan hormonas esteroides sexuales, entre ellas la testosterona.

Testosterona (T): es la principal hormona esteroidea sexual en los varones, pertenece al grupo de los andrógenos; se produce principalmente en los testículos dentro de las células de Leydig, aunque las glándulas suprarrenales pueden secretar cantidades pequeñas. Durante el desarrollo embrionario se encarga de diferenciar al aparato reproductor masculino y en la pubertad proporciona los caracteres sexuales secundarios.

Tirosina: aminoácido no esencial en los mamíferos, está formado por un carbono central alfa (C α) unido a un átomo de hidrógeno (-H), un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH₂) y una cadena lateral (grupo fenólico).

Tirosincinasas: enzimas con la capacidad de transferir un grupo fosfato a un residuo de tirosina de una proteína, o a sitios de unión de las proteínas sustrato.

EFECTO DE LOS COMPUESTOS PERFLUORADOS EN LA REPRODUCCIÓN

Mario Teteltitla Silvestre,^{1,2}
Verónica Souza Arroyo,¹
José Miguel Betancourt Rule,¹
Alejandro Domínguez Campuzano,^{1,2}
Diana Lisbeth Flores Martínez³ e
Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez^{1*}

¹ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 CDMX, México.

² Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 CDMX, México.

³ Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 CDMX, México. *Correo electrónico: duco@xanum.uam.mx

1. Introducción

A través de la historia, la humanidad se ha enfrentado a diversas circunstancias que han puesto en peligro a todos los seres vivos (plantas y animales), riesgos de variada naturaleza que van desde fenómenos naturales, guerras, epidemias, o contaminación con diferentes compuestos que se encuentran en el ambiente. La mayoría de dichos compuestos fueron sintetizados por el hombre para mejorar su calidad de vida; sin embargo, estas sustancias son capaces de afectar a los individuos expuestos, aun sin ser los organismos blanco para los cuales fueron diseñados, por ejemplo, el caso de los plaguicidas y herbicidas (Sacchetti *et al.*, 2015). Hoy en día existe una gran preocupación sobre los efectos de los agentes xenobióticos en animales silvestres y en los humanos, ya que su desempeño se puede alterar cuando se encuentran expuestos a contaminantes de distinta naturaleza, ya sea física, química o biológica. En la última década, la investigación se ha enfocado a evaluar el efecto de la exposición a sustancias como los bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas organoclorados y organofosforados, ftalatos, compuestos perfluorados (PFCs), etcétera, en la salud humana. En esta revisión nos concentraremos en analizar los efectos de los PFCs en la reproducción.

1.1 Toxicología reproductiva

La toxicología reproductiva es la rama de la Toxicología que estudia el impacto deletéreo producido por xenobióticos en la reproducción, incluye

los trastornos sobre la fertilidad, el desarrollo embrionario y alteraciones en la descendencia (Repetto, 1997). Los xenobióticos pueden ser agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos (Bonilla *et al.*, 2001). Los trastornos en la fertilidad abarcan efectos en la libido, el comportamiento sexual, espermatogénesis y ovogénesis, la actividad hormonal, el proceso de fertilización y el desarrollo del cigoto hasta la fase de implantación (Caméan y Repetto, 2006).

1.2 Los compuestos perfluorados

Los PFCs son un grupo de productos químicos que no se encuentran naturalmente en el medio ambiente y se han utilizado desde la década de los 50. La estructura de estos productos está constituida por una cadena de carbonos rodeados por átomos de flúor y un grupo ácido o amida situado en el extremo de la cadena de carbonos; son compuestos muy estables, hidrófobos y oleófobos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2009). Estas propiedades únicas han dado lugar a su amplio uso, por ejemplo, en formulaciones protectoras de cartón, alfombras y productos de cuero, en la industria textil como repelente al agua y la grasa. Los PFCs se han utilizado también en las espumas contra incendios y en la producción de recubrimientos antiadherentes en utensilios de cocina y algunas prendas de vestir (DRAFT, 2011).

Los PFCs con mayor volumen de producción son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA); seguidos de éstos, con una cantidad menor de producción, se encuentran el sulfonato de perfluorohexano (PFHxS) y el ácido perfluorononanoico (PFNA). Sólo en Estados Unidos la producción reportada de PFOS y PFOA en 2002 fue de 6,804 kg y 226,796 kg, respectivamente (DRAFT, 2011). Los precursores de los PFCs son alcoholes fluoroteloméricos (FTOHs), cuyos volúmenes de fabricación han sido estimados en 11,000-14,000 ton, después de 2002, originando una producción global de 44,000-80,000 ton para los ácidos

carboxílicos perfluorados (PFCA) (entre 1951-2004) y de 96,000 ton de fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF) (entre 1970 y 2002), respectivamente (Zhao *et al.*, 2012). En la tabla 1 se muestran los PFCs más conocidos y abundantes que se encuentran en productos alimenticios de consumo humano de la población de Cataluña, España (Castells *et al.*, 2012).

Los PFCs son altamente persistentes en el ambiente y son capaces de resistir condiciones extremas; debido a estas características son adecuados para aplicarlos en utensilios de cocina que resisten altas temperaturas y en la elaboración de materiales que tienen contacto con ácidos o bases fuertes. Los enlaces carbono-flúor son muy fuertes, lo que causa la permanencia de estas sustancias en el ambiente (ATSDR, 2009; Weiss *et al.*, 2009). Se descomponen muy lentamente en el aire y el suelo, pasando de este último al agua subterránea, que recorre grandes distancias por las corrientes oceánicas hasta llegar a los lugares más remotos (Giesy *et al.*, 2001). Los precursores de los PFCs, los FTOHs, son sustancias muy volátiles capaces de ser transportadas por amplios trayectos y ser degradadas a PFCs a través de mecanismos abióticos y bióticos. Debido a esto, se han detectado niveles considerables de PFCs en lugares lejanos a los sitios de producción y consumo, como el Ártico y el Atlántico Norte, en donde las concentraciones reportadas van de 130 a 650 pg/L, y el Mar de Groenlandia, cuyas concentraciones oscilan entre 45 y 280 pg/L (Gabrielsen, 2012; Zhao *et al.*, 2012).

1.3 Vías de exposición a compuestos perfluorados

En los últimos años se han incrementado los estudios en animales y humanos expuestos a los PFCs, ya que existen evidencias de la acumulación de estos compuestos en los organismos (Cassone *et al.*, 2012). Hay reportes que indican que en el plasma sanguíneo humano existen concentraciones más altas de PFCs que de otros compuestos; por ejemplo, las concentraciones pueden ser hasta 50 veces mayores que de los PCBs y 450 más que de hexaclorobenceno (Kärman *et al.*, 2006).

Los PFCs pueden ingresar al cuerpo a través de los pulmones, cuando se respira aire que los contiene (actualmente hay poca información sobre la cantidad, la velocidad y qué tipos entran en mayor cantidad por esta vía; Fraser *et al.*, 2013); también lo hacen a través del tracto digestivo, mediante el consumo de alimentos o agua contaminada, o bien, por la piel, cuando se tiene contacto con polvos, aerosoles o líquidos (Domingo, 2012). En la figura 1 se ilustran las posibles vías de absorción de algunos compuestos tóxicos entre los cuales están los PFCs.

Se han reportado diferentes concentraciones de compuestos perfluorados en productos tan variados como aquellos de uso personal, en contenedores de alimentos, recipientes desechables, recipientes herméticos, utensilios de cocina e incluso en algunos alimentos como la miel (Eom *et al.*, 2014; Surma *et al.*, 2016). Sin embargo, los productos del mar como pescados y mariscos son la principal fuente de exposición (Haug *et al.*, 2010). El análisis del plasma sanguíneo de poblaciones ubicadas en el norte de Noruega y las Islas Feroe (Reino de Dinamarca) confirmaron la relación entre la presencia de estos compuestos y su dieta diaria (Weihe *et al.*, 2008; Rylander *et al.*, 2009).

Actualmente existe la preocupación de una posible exposición a estos compuestos mediante agua contaminada, de tal manera que tanto en Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), como la EPA y la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) en Estados Unidos, han emitido recomendaciones sobre los límites permisibles de dichos compuestos en agua para el consumo humano; por ejemplo, en el estado de Minnesota, los niveles permisibles de PFOS y PFOA son de 300 ng/L (Grandjean y Budtz-Jørgensen, 2013).

Es posible que cantidades pequeñas de PFCs ingresen al cuerpo a través de la piel, una vez dentro del organismo se unen a la albúmina del suero sanguíneo, a través de la cual se transportan y bioacumulan en órganos como hígado y riñón, por mencionar algunos (Zhang *et al.*, 2009; Governini *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2011; Buck Louis *et al.*, 2015). En la figura 2 se concentran los porcentajes de ingesta de PFCs de acuerdo con los alimentos que se consumen diariamente en una población de Cataluña.

En el humano, el PFOA y el PFOS tienden a permanecer sin cambios durante largos periodos; se ha reportado que la vida media de estos contaminantes es de 3.5 a 7.5 años en el plasma sanguíneo (Shankar *et al.*, 2011; Buck Louis *et al.*, 2015).

1.4 Vías de eliminación de los compuestos perfluorados

A diferencia de otros compuestos como los PCBs, los PFCs no se pueden eliminar mediante la transpiración corporal (Genuis *et al.*, 2013). La principal vía para desecharlos es la orina; también se ha observado que la leche materna puede ser otra forma de eliminación que a su vez puede contribuir a la exposición de los lactantes a estos agentes, ya que se han detectado concentraciones importantes de estos compuestos en ella (Goosey y Harrad, 2012; Mondal *et al.*, 2014). En un estudio realizado en la población japonesa femenina, se encontraron evidencias sobre la eliminación de los PFCs mediante el sangrado menstrual, ya que los niveles de dichos compuestos en plasma sanguíneo disminuyeron más rápidamente en mujeres que en hombres (Harada y Koizumi, 2009).

Algunos reportes indican que en embarazadas y durante la lactancia la concentración de PFCs disminuyó en el plasma sanguíneo, debido a la transferencia de estos contaminantes al feto, a través del cordón umbilical, y al recién nacido por medio de la leche (en la que se localizaron hasta nueve PFCs) (von Ehrensteina *et al.*, 2009; Whitworth *et al.*, 2012). Estos datos indican un alto riesgo de exposición de los individuos a diferentes tóxicos desde el inicio de su vida.

2. Los compuestos perfluorados en la reproducción

Las altas concentraciones de PFCs encontradas en plasma de animales y humanos se han relacionado con padecimientos que afectan a los individuos

expuestos; por ejemplo, en la rata, con la aparición de tumores en el hígado. Estudios *in vivo* en roedores también han mostrado diversos efectos sobre la neuroendocrinología, la reproducción y el desarrollo embrionario (EPA, 2012).

Actualmente se ha reportado un descenso en la fertilidad en los humanos, hoy en día se calcula que a nivel mundial 15% de las parejas en edad reproductiva sufren algún problema relacionado con la fertilidad, cifra que podría llegar a ser aproximadamente de 70 millones de parejas, lo cual se ha relacionado con la exposición a diferentes agentes xenobióticos, entre los que están los PFCs (Teg-Nefaah *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2015).

2.1 Alteraciones relacionadas con la reproducción masculina

Los estudios epidemiológicos que relacionan la fertilidad masculina con los PFCs están en sus inicios, a diferencia de los que se han realizado en animales experimentales que sugieren que estos compuestos alteran la fecundidad. En roedores expuestos a estos contaminantes se ha reportado una disminución de la testosterona sérica y una reducción en el peso de las glándulas sexuales accesorias (Bookstaff *et al.*, 1990). En el humano, a pesar de varios reportes epidemiológicos, aún existe controversia entre la relación de los PFCs y las enfermedades reproductivas. La infertilidad en los varones es un problema ampliamente investigado; se ha estimado que del total de los casos reportados de infertilidad de pareja, de 20 a 30% recae en el hombre (Agarwal *et al.*, 2015).

Actualmente hay pocos reportes que asocien la exposición a PFCs y diversas alteraciones en la salud masculina. Nordström *et al.*, (2009) y Toft *et al.*, (2012) expusieron problemas relacionados con la calidad del semen, como defectos en la morfología de los espermatozoides y daño en la integridad del ADN; otros autores han observado efectos similares (Vested *et al.*, 2013), quienes indican una posible asociación entre la exposición a PFOS y PFOA durante la vida intrauterina y su repercusión en la calidad

del semen, volumen testicular y niveles de las hormonas reproductivas en hombres adultos. La exposición al PFOA durante la vida intrauterina indicó una tendencia en el aumento de LH y FSH en el adulto, además de una baja concentración espermática. En una población danesa de jóvenes de 19 años se encontró vínculo entre altas concentraciones de PFOS, PFOA y PFHxS en el plasma sanguíneo y una disminución en la concentración espermática normal, de 15.5 a 6.2 millones de espermatozoides (Nordström *et al.*, 2009). Aún existe controversia entre la relación de PFOS y PFOA con la fertilidad masculina, ya que en un estudio posterior llevado a cabo en varones de la misma nacionalidad sometidos a análisis en clínicas de infertilidad no se encontró correspondencia entre la concentración de PFOS y PFOA en el plasma y el volumen de semen, concentración y movilidad espermática (Raymer *et al.*, 2012).

En un trabajo posterior se examinaron seis PFCs: acetato de 2-(N-metilperfluorooctano sulfonamida) (Me-PFOSA-AcOH), ácido perfluorodecanoico (PFDeA), PFNA, sulfonamida de perfluorooctano (PFOSA), PFOS y PFOA y su vínculo con la calidad espermática en 17 muestras de semen de hombres estadounidenses. El PFOSA se asoció con cabezas de menor tamaño, un bajo porcentaje de capacidad de tinción en el ADN y un mayor porcentaje de espermatozoides bicéfalos e inmaduros. El PFDeA, PFNA, PFOA y PFOS tuvieron relación con un menor porcentaje de espermatozoides con flagelos enroscados. Todo esto sugirió que algunos de los compuestos mencionados pueden causar un efecto indeseable, pero se indica una necesidad de realizar más trabajos para corroborar estos hechos (Buck Louis *et al.*, 2015).

2.2 Alteraciones relacionadas con la reproducción femenina

Aunque hay estudios en animales y humanos que indican una relación entre la exposición a los PFCs y alteraciones en las funciones reproductivas,

existen escasas publicaciones sobre el efecto de estos compuestos en la fertilidad de la hembra. Domínguez *et al.* (2016) reportaron un efecto adverso del PFOS en la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos de cerdas prepúberes expuestos durante su maduración, siendo 32 y 22 μM la concentración letal 50 y la inhibición de la maduración 50, respectivamente.

Los PFCs, como ya se ha mencionado, pueden encontrarse en plasma sanguíneo; además, en mujeres se ha reportado su presencia en el fluido folicular. Estos compuestos se han relacionado con diversas patologías como el síndrome de ovario poliquístico (Vagi *et al.*, 2014), endometriosis (Buck Louis *et al.*, 2012), alteraciones en el ciclo menstrual (Lyngsø *et al.*, 2014) y aparición de menopausia precoz (Konkel, 2014). Además, se han relacionado con la disminución de tasas de fertilización y de embarazo (Governini *et al.*, 2011; Jacquet *et al.*, 2012). A continuación se indica la relación que existe entre los PFCs, algunas patologías y los estudios efectuados.

Síndrome de ovario poliquístico (SOP): trastorno caracterizado por hiperandrogenemia, aumento de LH, hiperestrogenemia e hiperprolactinemia, a menudo asociado con resistencia a la insulina. Es la endocrinopatía más común en mujeres en edad reproductiva, capaz de aumentar el riesgo de infertilidad, patología endometrial y enfermedad cardiometabólica (Builes *et al.*, 2006; Bremer, 2010; Barthelmess y Naz, 2015). En una investigación hecha por Vagi *et al.*, (2014) se planteó una correlación entre las concentraciones de contaminantes ambientales específicos –como los insecticidas organoclorados, ftalatos y PFCs– y el SOP. Los resultados del estudio respecto de los PFCs indicaron una mayor probabilidad de SOP en mujeres con altas concentraciones séricas de PFOA y PFOS.

Endometriosis: enfermedad crónica que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera del útero y se puede presentar en mujeres de todos los grupos étnicos y sociales, la prevalencia reportada es de alrededor

de 10% en la población general (Moradi *et al.*, 2014). En la actualidad, la incidencia de endometriosis se ha vinculado con la exposición a contaminantes ambientales persistentes. Buck Louis *et al.* (2013) observaron una correlación entre la concentración plasmática de PFOS y PFOA y una mayor probabilidad de endometriosis moderada o grave. A pesar de esto, se requieren más estudios que permitan aclarar esta posible asociación y, de ser así, averiguar los mecanismos de acción que desencadena esta patología.

Alteraciones en el ciclo menstrual: la presencia de PFOA en el plasma sanguíneo se relacionó con un alargamiento de los ciclos menstruales en mujeres de Groenlandia, Ucrania y Polonia. En la población danesa también se atribuyó un retardo en el tiempo para lograr la gestación y baja fecundidad a la exposición a PFOS y PFOA (Lyngsø *et al.*, 2014).

Menopausia precoz: la menopausia es un proceso fisiológico en el que la mujer deja de ovular y se presenta normalmente entre los 40 y 50 años. La menopausia temprana ocurre antes de los 40 años y se ha relacionado con un mayor riesgo cardiovascular y puede ser indicador de envejecimiento biológico. El aumento del riesgo cardiovascular en la menopausia puede ser consecuencia de la privación de estrógenos, o como resultado de hipertensión, diabetes, obesidad visceral, dislipidemia y disfunción endotelial, que se producen con el envejecimiento (Ebong *et al.*, 2014). En un análisis llevado a cabo en mujeres estadounidenses se evaluó la posible asociación entre las concentraciones plasmáticas de PFOA, PFOS, PFNA y PFHxS y la aparición de una menopausia temprana (Konkel, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Los resultados mostraron que aquellas con concentraciones plasmáticas elevadas tuvieron una mayor probabilidad de presentar menopausia precoz, en comparación con las de niveles bajos de estos compuestos; el estudio también reveló que las mujeres con concentraciones altas de PFHxS registraron probabilidad de 3.5 veces más de sufrir una histerectomía.

3. Los compuestos perfluorados como disruptores endocrinos

Los PFCs son considerados disruptores endocrinos, que son sustancias exógenas capaces de interferir con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión al sitio blanco o la eliminación de hormonas naturales presentes en el cuerpo, las cuales son responsables de la homeostasis, la reproducción y el proceso de desarrollo (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Knox *et al.*, 2011). En un trabajo de Fields (2008), en la línea celular PC-12 de rata, se reportó que PFOSA, PFOS, PFOA y PFBS disminuyeron la viabilidad y capacidad de sintetizar ADN y reproducirse. El PFOSA fue el que mostró daños más evidentes, ya que evitó casi en su totalidad la síntesis de ADN, la división celular y aumentó la producción de estrés oxidante, aun en concentraciones bajas.

Datos colectados por la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) en 2007, indicaron que 98% de las muestras de sangre tomadas de personas adultas en Estados Unidos revelaron la presencia de PFOS y PFOA (Haug *et al.*, 2010), lo que significa que aun la población no laboralmente expuesta presenta riesgo de acumular estas sustancias potencialmente tóxicas que se encuentran en el ambiente o en productos de consumo. Estos compuestos son capaces de alterar la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-ovario y provocar alteraciones en los ciclos menstruales, así como retardar la ovulación. Además, el PFOA y el PFOS pueden afectar la función hormonal (Jensen y Leffers, 2008; Zhao *et al.*, 2010). El PFOA puede alterar la producción de hormonas esteroides vía ovárica como un disruptor endocrino. En roedores, la exposición durante la gestación produjo alteraciones a corto o largo plazo, pero se ha sugerido que la posibilidad de daño no es igual en todas las especies (White *et al.*, 2011).

Los PFCs como disruptores endocrinos se han analizado en diferentes sistemas *in vitro*. En un estudio en células humanas de carcinoma adrenocortical (H295R) se investigó el efecto de estas sustancias, los resultados mostraron que el PFOS alteró la esteroidogénesis e incrementó

de manera concentración-respuesta la secreción de estradiol, progesterona y testosterona, aunque en menor cantidad estas dos últimas hormonas. El PFOA y el PFNA disminuyeron la viabilidad; este último, a altas concentraciones, indujo la apoptosis en estas células (Kraugerud *et al.*, 2011). En la línea celular MFC7 BOS de cáncer mamario se observó que tanto el PFOS como el PFOA tuvieron efecto estrogénico en concentraciones de 0.03-30 µg/ml y 30 µg/ml, respectivamente, mientras que una coexposición con los PFCs y 17 β estradiol (E) presentó un efecto antiestrogénico, por lo cual estos compuestos pueden constituir una fuente de xenoestrógenos en animales y humanos (Henry y Fair, 2013).

4. Efecto de los compuestos perfluorados en la fertilización

La fertilización es el proceso en el cual se unen los gametos masculino y femenino, formando un cigoto; finalmente su desarrollo da origen a un nuevo organismo. La fertilización involucra varios procesos, como la adecuada maduración del ovocito y del espermatozoide, el reconocimiento y la unión de los gametos para que se lleve a cabo el subsecuente crecimiento embrionario (Betancourt *et al.*, 2003). Dicho proceso puede ser vulnerable y estudios recientes indican que los PFCs tienen el potencial dañar la fertilidad humana.

Algunos reportes indican que los PFCs alteran la fertilidad en las mujeres. En pacientes sometidas a programas de fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria se observó una relación entre altas concentraciones de PFCs en el fluido folicular y una disminución en la calidad de los ovocitos, menores porcentajes de fertilización y número de embriones producidos, en comparación con el grupo que no presentó estos compuestos en dicho fluido (Governini *et al.*, 2011). No obstante, existe controversia en estos hechos, ya que en un estudio se documentó que altas concentraciones de PFOS y PFOA aumentaron 2.1% la probabilidad

de subfertilidad en mujeres noruegas multíparas, mientras que en nulíparas no se halló una asociación entre estos xenobióticos y la subfertilidad (Whitworth *et al.*, 2012). En un estudio más reciente, Buck *et al.* (2013) advirtieron que la presencia del PFOSA en el plasma sanguíneo coincidió con la disminución en la fertilidad femenina.

5. Alteraciones durante la gestación y el desarrollo embrionario

En los últimos años se han incrementado los estudios sobre los efectos de los PFCs durante la gestación y el desarrollo embrionario humano, ya que existen evidencias de efectos adversos de estos compuestos en animales. Fei *et al.* (2007) reportaron que PFOS y PFOA podrían alterar la homeostasis de las hormonas sexuales y los han asociado con la incidencia de reabsorciones fetales y la pérdida de gestación en animales de laboratorio. Análisis efectuados con embriones de hámster mostraron que los PFCs alteraron su morfología cuando las hembras fueron expuestas a éstos durante la gestación, observándose una disminución en la masa corporal al nacimiento y un descenso en el crecimiento de los órganos y el esqueleto de tales roedores (Fei *et al.*, 2008; Jacquet *et al.*, 2012; Koustas *et al.*, 2014). Otro estudio *in vivo*, también en roedores, determinó que la exposición prenatal al PFOA fue capaz de aumentar el tamaño del hígado y disminuir el tejido mamario en los individuos (Macon *et al.*, 2011).

Woodruff *et al.* (2011) demostraron que cerca del 100% de las mujeres estadounidenses embarazadas presentaba diferentes contaminantes ambientales en el plasma sanguíneo, entre éstos, PFCs; los resultados mostraron la presencia de al menos cuatro de ellos. Actualmente se ha reportado que durante el embarazo la madre, además de brindar nutrientes al feto, también puede exponerlo a ciertos contaminantes como los PFCs, lo que se ha comprobado en diversos estudios, ya que

se ha encontrado PFOA en el cordón umbilical y en el líquido amniótico (Mondal *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2012).

Los PFCs también se han relacionado con afectaciones en la salud de la mujer, como preeclampsia durante el embarazo. Starling *et al.* (2014) evaluaron una posible relación entre los PFCs y la preeclampsia en noruegas, en dicho estudio participaron 466 mujeres, todas ellas con diferentes niveles de PFCs en su plasma sanguíneo; sin embargo, los resultados indicaron que no hubo correlación entre las concentraciones y un mayor riesgo de sufrir preeclampsia en nulíparas.

6. Los compuestos perfluorados y su efecto neurotóxico

Se ha reportado que los PFCs son sustancias potencialmente neurotóxicas en animales altamente expuestos y que también pueden afectar los niveles de proteínas de importancia funcional durante el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis (Chun-Yang *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2009). En 2011, White *et al.* postularon al PFOA como un tóxico del desarrollo, ya que dicho compuesto fue responsable de diversos problemas de salud en roedores, también encontraron que la magnitud de las alteraciones endocrinas dependió del grado de exposición y de la respuesta en cada especie.

Algunos estudios se han enfocado en analizar el impacto de estos compuestos en el desarrollo de los individuos; Fei y Olsen (2011) examinaron una cohorte de nacimientos en Dinamarca en la que se analizó el posible efecto en el comportamiento o problemas de coordinación en niños de siete años expuestos en la etapa prenatal a PFCs. A pesar de que todos los menores que participaron en el estudio tuvieron contacto con PFOA y PFOS, los resultados mostraron que independientemente de los niveles de PFCs de las madres en la etapa prenatal, no existió ninguna correlación entre los niveles de estos xenobióticos y los problemas de conducta o de coordinación motora en la infancia.

7. Efecto de los compuestos perfluorados en el nacimiento

Los niños, especialmente los recién nacidos, son más sensibles a los contaminantes ambientales en comparación con los adultos. En los primeros meses de vida las vías metabólicas son inmaduras y la capacidad del bebé para metabolizar y eliminar muchas toxinas es diferente a la de los adultos. Aunque las exposiciones hayan ocurrido durante el periodo fetal o neonatal, sus secuelas pueden ser a veces observadas en años posteriores, por lo cual se necesitan más estudios para esclarecer los efectos de estas sustancias en la salud humana (Ünüvar y Büyükgebiz, 2012).

Se ha sugerido que el PFOS y el PFOA son capaces de reducir el peso de niños al nacimiento en un promedio de 69 y 104 g, respectivamente (Betts *et al.*, 2007), estos datos fueron apoyados por otros investigadores. Fei *et al.* (2008) investigó en mujeres danesas que presentaban diferentes concentraciones de PFOA y PFOS en la sangre durante el embarazo temprano, los resultados mostraron una disminución en la longitud y peso de los recién nacidos, además de menor tamaño de la cabeza, lo que sugiere que la exposición fetal al PFOA puede afectar el crecimiento de órganos y esqueleto; la presencia de PFOS no se asoció con ninguno de los parámetros analizados. En niñas británicas, tanto el PFOS como el PFOA redujeron el peso al momento del nacimiento en un promedio de 140 y 108 g, respectivamente, en comparación con las niñas expuestas a bajas concentraciones en la etapa prenatal (Maisonet *et al.*, 2012).

En otros trabajos se ha dado seguimiento al desarrollo y la calidad de vida durante la infancia de las personas que han tenido contacto con PFCs durante la gestación. Ode *et al.*, (2014) evaluaron una posible asociación entre la exposición fetal a PFOS, PFOA y PFNA y el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD) en un grupo de niños nacidos en Suecia. Los resultados indicaron que no hubo relación entre el ADHD y la exposición a los PFCs en la etapa fetal.

En la población canadiense se puso de manifiesto que las hijas de mujeres con PFOA y PFHxS en el plasma, aun en bajas concentraciones (1.61 y 4.46 ng/ml), tienen posibilidad de presentar alteraciones en la fertilidad (Vélez *et al.*, 2015).

8. Los compuestos perfluorados y el aborto involuntario

La toxicidad de los PFCs se ha demostrado en animales de laboratorio; actualmente se tienen reportes que indican que altas concentraciones de PFOA y PFOS son capaces de aumentar la mortalidad neonatal, inhibir el crecimiento fetal y reducir el tamaño de la camada (Lau *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de estos reportes, aún hay pocos datos de estos compuestos y su relación sobre dicha condición en la salud humana.

Kold *et al.* (2015) evaluaron la relación entre las concentraciones plasmáticas de PFCs y el aborto involuntario en Dinamarca y encontraron una asociación entre éste y las concentraciones séricas de PFDA, PFHxS y especialmente de PFNA. Dichos hallazgos son de vital importancia para la salud pública, pero aún se requiere de más estudios para conocer si este patrón se repite en todos los países.

9. Conclusión

Los PFCs son ubicuos, capaces de bioacumularse en plantas, animales y seres humanos. Su efecto negativo se ha estudiado más en animales que en personas. En la salud reproductiva de la gente, diversos autores reportan el efecto adverso de los PFCs en diferentes poblaciones; sin embargo, aún no queda completamente claro, ya que cada organismo responde de diferente manera a estos xenobióticos, dependiendo del grado de exposición. Además, no todos los patrones se presentan en diferentes

poblaciones, lo que podría deberse al grado de sensibilidad, la raza o el tipo de alimentación de cada una de ellas. A pesar de los estudios realizados, aún se necesitan análisis más completos que permitan conocer los mecanismos de acción de los PFCs en los sistemas biológicos, ya que aún se encuentran en sus inicios.

=====

Tabla 1. PFCs más abundantes en diversos alimentos (Castells *et al.*, 2012)

Compuestos	Abreviación	Fórmula molecular
Ácido perfluorobutanoico	PFBA	$C_4F_9O_2H$
Ácido perfluoropentanoico	PFPeA	$C_5F_{11}O_2H$
Ácido perfluorobutasulfonato	PFBuS	$C_4F_9SO_3^-$
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	$C_6F_{13}CO_2H$
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	$C_7F_{15}CO_2H$
Ácido perfluorohexasulfonato	PFHxS	$C_6F_{13}SO_3^-$
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	$C_8F_{17}CO_2H$
Ácido 1H, 1H, 2H, 2H -perfluorooctanosulfónico	THPFOS	$C_7F_{15}C_2H_4SO_3^-$
Ácido perfluorononanoico	PFNA	$C_9F_{19}CO_2H$
Ácido perfluorooctanosulfonato	PFOS	$C_8F_{17}SO_3^-$
Ácido perfluorodecanoico	PFDA	$C_{10}F_{21}CO_2H$
Ácido perfluoroundecanoico	PFUnDA	$C_{11}F_{23}CO_2H$
Perfluorodecanosulfonato	PFDS	$C_{10}F_{21}SO_3^-$
Ácido perfluorododecanoico	PFToDA	$C_{12}F_{25}CO_2H$
Ácido perfluorotridecanoico	PFTTrDA	$C_{14}F_{29}CO_2H$
Ácido perfluorotetradecanoico	PFTDA	$C_{14}F_{29}CO_2H$
Ácido perfluorohexadecanoico	PFHxDA	$C_{16}F_{33}CO_2H$
Ácido perfluorooctadecanoico	PFOcDA	$C_{18}F_{37}CO_2H$

Figura 1. Posibles rutas de penetración de algunos compuestos tóxicos y su distribución en un organismo (modificado de Bello *et al.*, 2001)

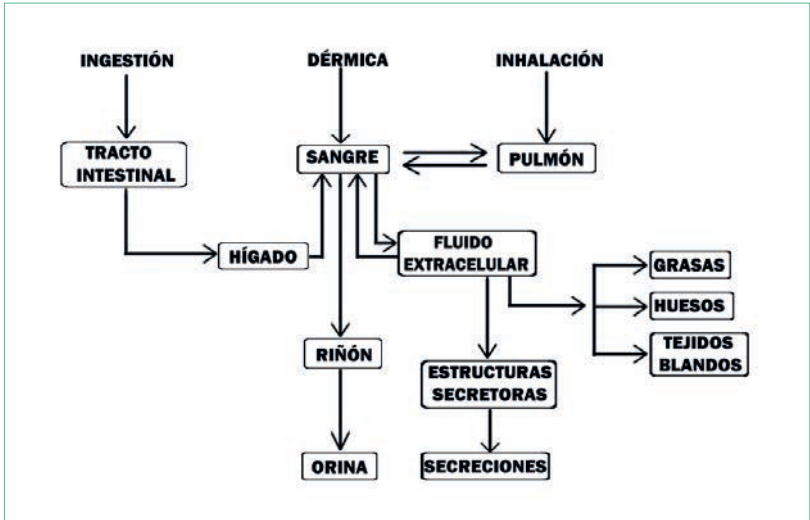
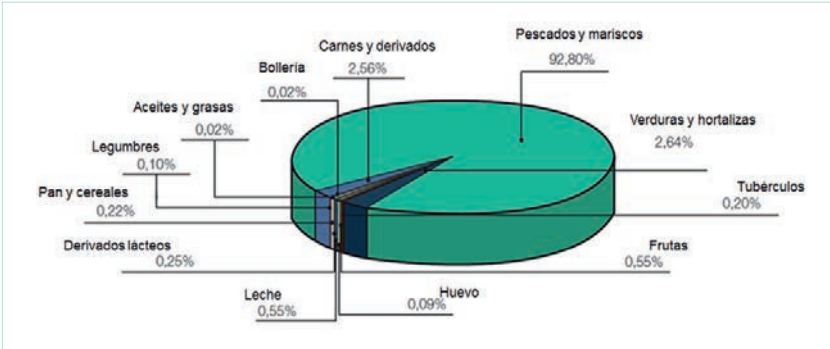


Figura 2. Porcentaje de PFCs en una dieta diaria



El grupo de pescados y mariscos es el mayor aportador de estos compuestos, con 103.62 ng/día, pero sólo representa 29% del total de la ingesta. Otros grupos importantes son las frutas, con 49.95 ng/día (14% del total), las verduras y hortalizas, con 46.69 ng/día (13% del total) (Castells *et al.*, 2012).

Referencias

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. y Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.*, 13, 37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2009). *Resumen de salud pública perfluoroalquilos*. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>
- Barthelmess, E. y Naz, R. (2015). Polycystic ovary syndrome: current status and future perspective. *Front Biosci.* (Elite Ed), 6, 104-119.
- Bello, J. y López de Cerain, A. (2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. España: editorial Día de Santos.
- Betancourt, M., Casas, E., Bonilla, E. y Ducolomb, Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. En *Biología celular y molecular* (pp. 679-710). México: Prentice Hall.
- Betts, K. (2007). PFOS and PFOA in Humans New Study Links Prenatal Exposure to Lower Birth Weight. *Environ Health Perspect.*, 115(11), A550-A552.
- Bonilla, E., Altamirano, M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb Y. y Betancourt, M. (2001). Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. En *Biología de la Reproducción II* (pp. 55-73), México: UAM-PUIS.
- Bookstaff, R., Moore, R., Ingall, G. y Peterson, R. (1990). Androgenic deficiency in male rats treated with perfluorodecanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 104(2) 322-333.
- Bremer, A. (2010). Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population. *Metab Syndr Relat Disord.*, 8(5), 375-394.
- Buck Louis, G., Peterson, M., Chen, Z., Hediger, M., Croughan, M., Sundaram R., Stanford, J., Fujimoto, V., Varner, M., Giudice, L., Kennedy, A., Sun, L., Wu, Q. y Kannan, K. (2012). Perfluorochemicals and endometriosis The ENDO Study. *Epidemiology*, 23(6), 799-805. doi:10.1097/EDE.0b013e31826cc0cf.
- Buck Louis, G., Sundaram, R., Schisterman, E., Sweeney, A., Lynch, C., Gore-Langton, R., Maisog, J., Kim, S., Chen, Z. y Barr, D. (2013). Persistent Environmental Pollutants and Couple Fecundity: The LIFE Study. *Environ Health Perspect.*, 121(2), 231-236.
- Buck, R., Franklin, J., Berger, U., Conder, J., Cousins, I., de Voogt, P., Astrup, A., Kannan, K., Mabury, S. y van Leeuwen, S. (2013). Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integr Environ Assess Manag.*, 7(4), 513-554.
- Buck Louis, G., Chen Zhen, Schisterman, E., Sungduk, K., Sweeney, A., Sundaram, R., Lynch, C., Gore-Langton, R. y Barr, D. (2015). Perfluorochemicals and Human Semen Quality: The LIFE Study. *Environ Health Perspect.*, 123(1), 57-63.

- Builes, C., Díaz, I., Castañeda, J. y Pérez, L. (2006). Caracterización clínica y bioquímica de la mujer con síndrome del ovario poliquístico. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(1), 36-44.
- Castells, V., Tascón, E., Gómez, J., Llobet, J., Perelló, G. y Domingo, J. (2012). *Contaminantes químicos. Estudio de dieta total en Cataluña 2008*. Agencia de Salud Pública de Cataluña y Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Recuperado de <http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir1593/doc34191.html>.
- Cassone, C., Vongphachan, V., Chiu, S., Williams, K., Letcher, R., Pelletier, E., Crump, D. y Kennedy, S. (2012). In Ovo Effects of Perfluorohexane Sulfonate and Perfluorohexanoate on Pipping Success, Development, mRNA Expression, and Thyroid Hormone Levels in Chicken Embryos. *Toxicological Sciences*, 127(1), 216-224.
- Caméan, A. y Repetto, M. (2006). *Toxicología alimentaria*. España: editorial Díaz de Santos.
- Chun-Yang, L., Xiang-Yao, L., Bei, W., Shumin, D. y Gui-Bin, J. (2008). Acute enhancement of synaptic transmission and chronic inhibition of synaptogenesis induced by perfluorooctane sulfonate through mediation of voltage-dependent calcium channel. *Environ Sci Technol.*, 42(14), 5335-5341.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., Zoeller, T. y Gore, A. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev.*, 30(4), 293-342. doi: 10.1210/er.2009-0002.
- Domingo, J. (2012). Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International*, 40, 187-195.
- Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teteltitla, M. y Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 35, 93-99.
- DRAFT. (2011). *Indicator for Third Edition of America's Children and the Environment*. Recuperado de www.epa.gov/ace/ace3drafts/
- Ebong, I., Watson, K., Goff, D., Bluemke, D., Srikanthan, P., Horwich, T. y Bertoni A. (2014). Age at Menopause and Incident Heart Failure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause*, 21(6), 585-591.
- Eom, J., Choi, J., Kim, J. y Kim, Y. (2014). A Survey of Exposure Level and Lifestyle Factors for Perfluorooctanoate and Perfluorooctane Sulfonate in Human Plasma from Selected Residents in Korea. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11(7), 7231-7241. doi: 10.3390/ijerph110707231.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2012). Emerging Contaminants Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA). 18(7), 438. Recuperado de http://www.epa.gov/fedfac/pdf/emerging_contaminants_pfos_pfoa.pdf
- Fei, Ch., McLaughlin, J., Tarone, R. y Olsen, J. (2007). Perfluorinated Chemicals and Fetal Growth: A Study within the Danish. National Birth Cohort. *Environ Health Perspect.*, 115(11), 1677-1682.
- Fei, Ch., McLaughlin, J., Tarone, R. y Olsen, J. (2008). Fetal Growth Indicators and Perfluorinated Chemicals: A Study in the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol.*, 168(1), 66-72.
- Fei, Ch. y Olsen, J. (2011). Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Behavioral or Coordination Problems at Age 7 Years. *Environ Health Perspect.*, 119(4), 573-578.

- Fields, S. (2008). Brain Effects Stick Around: PFCs and Neural Cell Development. *Environ Health Perspect.*, 116(6), A258.
- Fraser, A., Webster, T., Watkins, D., Strynar, M., Kato, K., Calafat, A., Vieira, V. y McClean, M. (2013). Polyfluorinated compounds in dust from homes, offices, and vehicles as predictors of concentrations in office workers' serum. *Environ Int.*, 60 128-136. doi: 10.1016/j.envint.2013.08.012.
- Gabrielsen Geir, W. (2012). Persistent organic pollutants and their effects on Arctic seabirds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(Suppl 1), S8. Recuperado de <http://www.actavetscand.com/content/54/S1/S8>
- Genuis, S., Beesoon, S. y Birkholz, D. (2013). Biomonitoring and Elimination of Perfluorinated Compounds and Polychlorinated Biphenyls through Perspiration: Blood, Urine, and Sweat Study. *Hindawi Publishing Corporation. ISRN Toxicology*. Article ID 483832, 7 pages. Recyperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2013/483832>
- Giesy, J., Kannan, K. y Jones, P. (2001). Global Biomonitoring of Perfluorinated Organics. *TheScientificWorld*, 1, 627-629. doi: 0.1100/tsw.2001.342 1
- Governini, L., Orvieto, R., Guerranti, C., Gambera, L., De Leo, V. y Piomboni P. (2011). The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *J Assist Reprod Genet.*, 28(5), 415-418.
- Goosey, E. y Harrad S. (2012). Perfluoroalkyl substances in UK indoor and outdoor air: Spatial and seasonal variation. *Environment International*, 45, 86-90.
- Grandjean P. y Budtz-Jørgensen, E. (2013). Immunotoxicity of perfluorinated alkylates: calculation of benchmark doses based on serum concentrations in children. *Environmental Health*, 12(1), 35.
- Harada, K. y Koizumi, A. (2009). Environmental and biological monitoring of persistent fluorinated compounds in Japan and their toxicities. *Environ Health Prev Med.*, 14(1), 7-19.
- Haug, L., Thomsen, C., Brantsæter, A., Kvalem, H., Haugen, M., Becher, G., Alexander, J., Meltzer, H. y Knutsen, H. (2010). Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment International*, 36(7), 772-778.
- Henry, N. y Fair, P. (2013). Comparison of in vitro cytotoxicity, estrogenicity and anti-estrogenicity of triclosan, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *J. Appl. Toxicol.*, 33(4), 265-272.
- Jacquet, N., Maire, A., Landkocz, Y. y Vasseur, P. (2012). Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Arch Toxicol.*, 86(2), 305-314.
- Jensen, A. y Leffers, H. (2008). Emerging endocrine disrupters: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl.*, 31(2), 161-169.
- Johansson, N., Eriksson, P. y Viberg, H. (2009). Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain. *Toxicol Sci.*, 108(2), 412-418.
- Kato, K., Wong, L.Y., Jia, L., Kuklenyik, Z. y Calafat, A. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: 1999-2008. *Environ Sci Technol.*, 45(19), 8037-8045.
- Kärman, A., van Bavel, B., Järnberg, U., Hardell, L. y Lindström, G. (2006). Perfluorinated chemicals in relation to other persistent organic pollutants in human blood. *Chemosphere*, 64(9), 1582-1591.

- Koustas, E., Lam, J., Sutton, P., Johnson, P., Atchley, D., Sen, S., Robinson, K., Axelrad, D. y Woodruff, T. (2014). The Navigation Guide-Evidence-Based Medicine Meets Environmental Health: Systematic Review of Nonhuman Evidence for PFOA Effects on Fetal Growth. *Environ Health Perspect.*, 122(10), 1015-1027.
- Konkel, L. (2014). PFCs and Early Menopause Association Raises Questions about Causality. *Environ Health Perspect.*, 122(2), A59.
- Kold Jensen, T., Bjørkholm Andersen, L., Boye Kyhl, H., Nielsen, F., Thybo, H. y Grandjean, P. (2015). Association between Perfluorinated Compound Exposure and Miscarriage in Danish Pregnant Women". *PLoS ONE.*, 10(4). doi: 10.1371/journal.pone.0123496.
- Knox, S., Jackson, T., Javins, B., Frisbee, S., Shankar, A. y Ducatman, A. (2011). Implications of Early Menopause in Women Exposed to Perfluorocarbons. *J Clin Endocrinol Metab.*, 96(6), 1747-1753.
- Kraugerud, M., Zimmer, K., Ropstad, E. y Verhaegen, S. (2011). Perfluorinated compounds differentially affect steroidogenesis and viability in the human adrenocortical carcinoma (H295R) in vitro cell assay. *Toxicol Lett.*, 10, 205(1), 62-68.
- Lau, Ch., Thibodeaux, J., Hanson, R., Narotsky, M., Rogers, J. y Lindstrom, A. (2006). Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol Sci.*, 90(2), 510-518.
- Lau, Ch., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A. y Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.*, 99(2), 366-394. doi:10.1093/toxsci/kfm128.
- Lyngsø, J., Ramlau-Hansen, C.H., Høyer, B.B., Støvring, H., Bonde, J.P., Jönsson, A.G., Lindh, Ch., Pedersen, J.B., Ludwicki, J., Zvezdai, V. y Toft G. (2014). Menstrual cycle characteristics in fertile women from Greenland, Poland and Ukraine exposed to perfluorinated chemicals: a cross-sectional study. *Hum Reprod.*, 29(2), 359-367. doi: 10.1093/humrep/det390.
- Macon, M., Villanueva, L.T., Tatum-Gibbs, K., Zehr, R., Strynar, M., Stanko, J., White, S., Helfant, L. y Fenton, S. (2011). Prenatal Perfluorooctanoic Acid Exposure in CD-1 Mice: Low-Dose Developmental Effects and Internal Dosimetry. *Toxicol Sci.*, 122(1), 134-145. doi: 10.1093/toxsci/kfr076.
- Maisonet, M., Terrell, M., McGeehin, M., Christensen, K.Y., Holmes, A., Calafat, A. y Marcus, M. (2012). Maternal Concentrations of Polyfluoroalkyl Compounds during Pregnancy and Fetal and Postnatal Growth in British Girls. *Environ Health Perspect.*, 120(10), 1432-1437. doi: 10.1289/ehp.1003096.
- Moradi, M., Parker, M., Sneddon, A., López, V. y Ellwood, D. (2014). Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Women's Health.*, 14,, 123.
- Mondal, D., López-Espinosa, M.J., Armstrong, B., Stein, C. y Fletcher, T. (2012). Relationships of Perfluorooctanoate and Perfluorooctane Sulfonate Serum Concentrations between Mother-Child Pairs in a Population with Perfluorooctanoate Exposure from Drinking Water. *Environ Health Perspect.*, 120(5), 752-757. doi: 10.1289/ehp.1104538.
- Mondal, D., Hernández, R., Armstrong, B., Gibson, L., López-Espinosa, M.J., Hyeong-Moo, S. y Fletcher, T. (2014). Breastfeeding: A Potential Excretion Route for Mothers and Implications for Infant Exposure to Perfluoroalkyl Acids. *Environ Health Perspect.*, 122(2), 187-192.

- Nordström Joensen, U., Bossi, R., Leffers, H., Jensen Astrup, A., Skakkebaek, N. y Jørgensen, N. (2009). Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality?. *Environ Health Perspect.*, 117(6), 923-927.
- Ode, A., Kallén, K., Gustafsson, P., Rylander, L., Jonsson, A.-G., Olofsson, P., Ivarsson, S., Lindh, Ch. y Rignell-Hydbom, A. (2014). Fetal Exposure to Perfluorinated Compounds and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Childhood. *PLoS ONE.*, 9(4), e95891. doi: 10.1371/journal.pone.0095891.
- Raymer, J., Michael, L., Studabaker, W., Olsen, G., Sloan, C., Wilcosky, T. y Walmer, D. (2012). Concentrations of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoate (PFOA) and Their Associations with Human Semen Quality Measurements. *Reprod Toxicol.*, 33(4), 419-427.
- Repetto, M. (1997). *Toxicología fundamental*. España: ed. Díaz de Santos España.
- Rylander, C., Brustad, M., Falk, H. y Sandanger, T. (2009). Dietary Predictors and Plasma Concentrations of Perfluorinated Compounds in a Coastal Population from Northern Norway. *J Environ Public Health*. doi:10.1155/2009/268219.
- Sacchetti, G., Calliera, M., Marchis, A., Glass, R., Butler-Ellis, C., Machera K., Gerritsen-Ebben, R., Spanoghe, P. y Capri, E. (2015). New risk indicator approach for Operators, Workers, Bystanders and Residents for a sustainable use of plant protection products. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 22(22), 17586-17595. doi: 10.1007/s11356-015-4889-5.
- Shankar, A., Xiao, J. y Ducatman, A. (2011). Perfluoroalkyl chemicals and elevated serum uric acid in US adults. *Clin Epidemiol.*, 3, 251-258. doi: 10.2147/CLEP.S21677.
- Starling, A., Engel, S., Richardson, D., Baird, D., Haug, L., Stuebe, A., Klungsøyr, K., Harmon, Q., Becher, G., Thomsen, C., Sabaredzovic, A., Eggesbø, M., Hoppin, J., Travlos, G., Wilson, R., Trogstad, L., Magnus, P. y Longnecker, M. (2014). Perfluoroalkyl Substances During Pregnancy and Validated Preeclampsia Among Nulliparous Women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study American. *Am J Epidemiol.*, 179(7), 824-33. doi: 10.1093/aje/kwt432.
- Stein, Ch., Wolff, M., Calafat, A., Kato, K. y Engel, S. (2012). Comparison of Polyfluoroalkyl Compound Concentrations in Maternal Serum and Amniotic Fluid: A Pilot Study. *Reprod Toxicol.*, 34(3), 312-316.
- Surma, M., Zielinski, H. y Piskunova, M. (2016). Levels of Contamination by Perfluoroalkyl Substances in Honey from Selected European Countries. *Bull Environ Contam Toxicol*, 97(1), 112-118. Doi: 10.1007/s00128-016-1840-5.
- Taylor, K., Hoffman, K., Thayer, K. y Daniels, J. (2014). Polyfluoroalkyl Chemicals and Menopause among Women 20-65 Years of Age (NHANES). *Environ Health Perspect.*, 122(2), 145-150. doi:10.1289/ehp.1306707
- Teg-Nefaah, P. y Baba, P. (2013). Understanding the Social Meaning of Infertility and Childbearing: A Qualitative Study of the Perception of Childbearing and Childlessness in Northern Ghana. *PLoS ONE*, 8(1): e54429. doi: 10.1371/journal.pone.0054429.
- Toft, G., Jonsson B.A. Lindh Ch., Giwercman, A., Spano, M., Heederik, D., Lenters, V., Vermeulen, R., Rylander, L., Pedersen Henning, S., Ludwicki, J., Zvezdai, V. y Bonde Jens, P. (2012). Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in arctic and European populations. *Hum Reprod.*, 27(8), 2532-4250. doi: 10.1093/humrep/des185.

- Ünüvar, T. y Büyükgebiz, A. (2012). Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.*, 4(2), 51-60.
- Vagi, S., Azziz-Baumgartner, E., Sjödin, A., Calafat, A., Dumesic, D., González L., Kato, K., Silva, M., Ye, X. y Azziz, R. (2014). Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol a in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *BMC Endocr Disord.*, 14, 86. doi:10.1186/1472-6823-14-86.
- Vested, A., Høst, C., Sjurður, F., Jens, P., Lund, S., Thorhallur, I., Becher, G., Småstuen, L., Hagen, E. y Toft, G. (2013). Associations of in Utero Exposure to Perfluorinated Alkyl Acids with Human Semen Quality and Reproductive Hormones in Adult Men. *Environ Health Perspect.* 121(4), 453-458. doi: 10.1289/ehp.1205118.
- Vélez, M., Arbuckle, T. y Fraser, W. (2015). Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study. *Hum Reprod.*, 30(3), 701-709. doi: 10.1093/humrep/deu350.
- Von Ehrensteina, O.S., Fenton, S.E., Kato, K., Kuklenyik, Z., Calafat, A.M. y Hines, E.P. (2009). Polyfluoroalkyl chemicals in the serum and milk of breastfeeding women. *Reprod Toxicol.*, 27(3-4), 239-245. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.03.001.
- Weihe, P., Kato, K., Calafat, A., Flemming, N., Wanigatunga, A., Needham, L. y Grandjean, P. (2008). Serum Concentrations of Polyfluoroalkyl Compounds in Faroese Whale Meat Consumers. *Environ Sci Technol.*, 42(16), 6291-6295.
- Weiss, J., Andersson, P., Lamoree, M., Leonards, P., van Leeuwen, S. y Hamers, T. (2009). Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol Sci.*, 109(2), 206-216.
- Whitworth, K., Haug, L., Baird, D., Becher, G., Hoppin, J., Skjaerven, R., Thomsen, C., Eggesbo, M., Travlos, G., Wilson, R. y Longnecker, M. (2012). Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women. *Epidemiology*, 23(2), 257-263. doi: 10.1097/EDE.0b013e31823b5031.
- Woodruff, T., Zota, A. y Schwartz, J. (2011). Environmental Chemicals in Pregnant Women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environ Health Perspect.*, 119(6), 878-885. doi: 10.1289/ehp.1002727.
- White, S., Fenton, S. y Hines, E. (2011). Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 127(1-2), 16-26.
- Zhang, X., Chen, L., Fei, X.C., Ma, Y.S. y Gao H.W. (2009). Binding of PFOS to serum albumin and DNA: insight into the molecular toxicity of perfluorochemicals. *BMC Mol Biol.*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-16>
- Zhao, Z., Xie, Z., Möller, A., Sturm, R., Tang, J., Zhang, G. y Ebinghaus, R. (2012). Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean and Antarctic coast. *Environ Pollut*, 170, 71-77. doi: 10.1016/j.envpol.2012.06.004.
- Zhao, Y., Tan, Y., Haslam, S. y Yang, Ch. (2010). Perfluorooctanoic acid effects on steroid hormone and growth factor levels mediate stimulation of peripubertal mammary gland development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci.*, 115(1), 214-224. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq030>

Glosario

ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades.

EFSA: autoridad europea de Seguridad Alimentaria.

FTOHs: alcoholes fluoroteloméricos.

Me-PFOSA-AcOH: acetato de 2-(N-metilperfluorooctano sulfonamida).

PCBs: bifenilos policlorados.

PFCs: compuestos perfluorados.

PFCA: ácidos carboxílicos perfluorados.

PFDA: ácido perfluorodecanoico.

PFNA: ácido perfluorononanoico.

PFHxS: sulfonato de perfluorohexano.

PFOA: ácido perfluorooctanoico.

PFOS: sulfonato de perfluorooctano.

PFOSA: sulfonamida de perfluorooctano.

PFOSF: fluoruro de perfluorooctano sulfonilo.

SOP: síndrome de ovario poliquístico.

MORFOFISIOLOGÍA DEL EPIDÍDIMO Y DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LA RATA WISTAR POSTERIOR A LA SACIEDAD SEXUAL

Yolanda López Ramírez,¹
Rosa Angélica Lucio,²
Edith Arenas Ríos,¹
José Luis Tlachi López,¹
Lorena Ruiz Valderrama¹ y
Mario García Lorenzana¹

¹ Departamento de Biología de la Reproducción; Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco #186, col. Vicentina. C.P. 09340, Iztapalapa, Ciudad de México.

² Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Carr. Tlaxcala-Puebla km 1.5, s/n, col. Loma Xicohtécatl, C.P. 90000, Tlaxcala, Tlax.

1. Introducción

Antes de referirnos a la saciedad sexual es conveniente recordar algunos aspectos de la conducta sexual masculina de la rata. Los machos presentan, de forma estereotipada, tres patrones motores durante la cópula, identificados como monta, intromisión y eyaculación. Durante el patrón de monta, con sus extremidades anteriores el macho palpa los flancos de la hembra y ejecuta movimientos pélvicos hacia adelante y hacia atrás sobre la grupa femenina. El patrón de intromisión inicia como el de la monta, distinguiéndose de ella porque el último de los movimientos pélvicos es profundo y se asocia con la inserción del pene erecto en la vagina. Inmediatamente sigue la brusca desmonta hacia atrás (Pollak y Sachs, 1976). Es muy común observar el acicalamiento genital tras las intromisiones. Después de varias montas e intromisiones intercaladas ocurre el patrón de eyaculación, caracterizado por el movimiento pélvico más profundo y sostenido que el de la intromisión, y se asocia con la deposición de semen en la vagina. Posteriormente, el macho eleva la porción superior del cuerpo, extendiendo lateralmente las extremidades anteriores. Finalmente se desmonta de manera lenta y se acicala la región genital (Larsson, 1956).

2. Particularidades de la eyaculación

La eyaculación se define como una respuesta fisiológica sexual masculina (Eguibar *et al.*, 2013); se trata de la salida vigorosa del fluido seminal por el

meato urinario (Lucio *et al.*, 2014). Se lleva a cabo en dos fases: la emisión seminal y la expulsión seminal. La emisión consiste en una serie de pasos: 1) la confluencia de las secreciones provenientes de las glándulas sexuales accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas coagulantes) en la uretra prostática; 2) transporte de los espermatozoides contenidos en la *cauda* epididimaria hacia la uretra prostática, por medio de contracciones de los conductos deferentes (órganos con capas de músculo liso con disposición circular y longitudinal, para intensificar la contracción y con ello promover el transporte de los espermatozoides) y 3) cierre del cuello de la vejiga urinaria y del esfínter externo de la uretra para evitar la eyaculación retrógrada (Eguibar *et al.*, 2013; Lucio *et al.*, 2014).

El sistema nervioso autónomo regula la emisión; el somático, la expulsión (Eguibar *et al.*, 2013). Ésta comprende la salida brusca del fluido seminal (espermatozoides y secreciones glandulares) por el meato urinario, producida por contracciones rítmicas del músculo liso de la uretra y de los músculos estriados del periné, que incluyen al isquiocavernoso y al bulboesponjoso (Eguibar *et al.*, 2013; Lucio *et al.*, 2014). Después de la primera eyaculación, el macho presenta el intervalo post-eyaculatorio cuya duración es, aproximadamente, de 10 minutos, en los cuales permanece sin actividad sexual (Eguibar *et al.*, 2013). En la rata, la mayor parte del plasma seminal del eyaculado se endurece, formando el tapón seminal (Blandau, 1945), que al adherirse fuertemente a las paredes vaginales y al cérvix favorece el transporte espermático transcervical. Dicho transporte ocurre durante los primeros cinco minutos después de la eyaculación (Matthews y Adler, 1977).

El intervalo post-eyaculatorio impide al macho retirar su propio tapón seminal antes de que ocurra el transporte de los espermatozoides que previamente depositó. La remoción del tapón por otro macho en menos de cinco minutos posterior a la eyaculación interrumpe el transporte espermático, resultando en la mínima o nula cantidad de espermatozoides transportados al útero (Matthews y Adler, 1977; Lucio *et al.*, 2014). Cuando ocurre la inserción del pene en la vagina, las espinas del pene se enganchan en

el tapón seminal, de modo que al retirar el pene, el tapón se desprende de las paredes vaginales y del cérvix, y se acerca al orificio vaginal. Bastan de tres a cuatro intromisiones para retirar el tapón seminal de la vagina.

3. Saciedad sexual masculina

La saciedad sexual empezó a estudiarse desde el punto de vista conductual (Larsson, 1956; Beach y Jordan, 1956), luego desde la perspectiva neuroendocrinológica y farmacológica (Rodríguez y Fernández, 1994; Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo, 2003) y recientemente se ha abordado con un enfoque ecofisiológico, es decir, considerando la influencia del medio ambiente sobre la conducta y la fisiología reproductiva, por lo que abarca no sólo las respuestas de un organismo en su entorno, sino también a su fisiología (Tlachi *et al.*, 2012; Lucio *et al.*, 2014).

Los machos de muchas especies presentan saciedad sexual que no se debe a la fatiga física del individuo, ya que su actividad motora es similar a la de los sujetos no saciados sexualmente, más bien responde a la pérdida de motivación sexual hacia la hembra (Larsson, 1956; Phillips y Fernández, 2009). La saciedad sexual puede alcanzarse por la cópula repetida con la misma o diferente hembra. Algunos machos realizan mínimo cinco (Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo, 2003) y máximo 18 eyaculaciones (Tlachi *et al.*, 2012). Los cambios que se observan conforme avanzan las series eyaculatorias son disminución en el número de intromisiones, incremento en la latencia de eyaculación y aumento en la duración del intervalo post-eyaculatorio (Larsson, 1956; Beach y Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1994).

4. El efecto Coolidge

Como se mencionó, la saciedad sexual masculina obedece a la pérdida de motivación sexual por copular con la misma hembra, de ahí que el hecho de reemplazarla incita nuevamente al macho. Tal sustitución representa

un estímulo novedoso tan efectivo, que restaura la conducta copulatoria que incluye la eyaculación. Esto significa que el restablecimiento conductual copulatorio es completo, ya que abarca los patrones motores de monta, intromisión y eyaculación (Larsson, 1956; Beach y Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1994; Phillips y Fernández, 2009). La reanudación copulatoria con hembras distintas se conoce como efecto Coolidge (Wilson *et al.*, 1963).

Este término fue utilizado por vez primera por Wilson *et al.* (1963) y proviene de una anécdota de uno de los ex presidentes de Estados Unidos (Calvin Coolidge). Se dice que un día el presidente y su esposa visitaron una granja avícola; a la señora Coolidge le llamó la atención que uno de los gallos copulara repetidamente, por lo que le preguntó al encargado de la granja cuántas veces al día copulaba ese macho. La respuesta fue: decenas de veces. Ella pidió que se comunicara el hecho al presidente. Cuando Calvin Coolidge fue informado sobre la conducta del gallo, preguntó: ¿el macho copula todas las veces con la misma gallina? La respuesta fue: no, el gallo lo hace con diferentes gallinas cada vez. El presidente asintió con la cabeza y dijo: por favor, díglele eso a la señora Coolidge (Bermant, 1976).

5. Expulsión seminal en lascópulas posteriores a la saciedad sexual

Se mencionó anteriormente que los machos sexualmente saciados durante el efecto Coolidge reanudan la cópula hasta la eyaculación con una hembra distinta. ¿Significa que expelen semen? Nuestro grupo ha demostrado que las ratas macho saciadas sexualmente con efecto Coolidge no expelen semen al presentar el patrón eyaculatorio, tal como se constata con la revisión de los conductos reproductivos femeninos. En efecto, Tlachi *et al.* (2012) y Lucio *et al.* (2014) describen gráficamente que no hay fluido seminal en los cuernos uterinos ni tapón seminal en la vagina, lo que evidencia que el patrón motor de eyaculación es independiente de la respuesta genital de expulsión

seminal. Cabe mencionar que inmediato a la saciedad sexual, 88% de los machos presentan el efecto Coolidge, reanudando la actividad copulatoria.

Los machos saciados sexualmente mantienen en la *cauda* del epidídimo 44% de espermatozoides respecto de la cantidad encontrada en las ratas macho no saciadas sexualmente (Tlachi *et al.*, 2012). De modo que los saciados tienen espermatozoides para seguir expeliendo, quizás no lo hacen porque las secreciones de las glándulas sexuales accesorias están ausentes. Se menciona que el eyaculado se compone de 1% de espermatozoides y 99% de plasma seminal; además, se ha evidenciado que en las eyaculaciones sucesivas disminuye el peso y tamaño del tapón seminal hasta desaparecer, lo que significa que las secreciones de las vesículas seminales y las glándulas coagulantes disminuyen hasta la mitad (Pessah y Kochva, 1975, Tlachi *et al.*, 2012). Si no hay secreciones glandulares no hay plasma seminal, lo que impide el transporte de los espermatozoides por la uretra hasta su salida por el meato uretral. Por otro lado, se sabe que los espermatozoides que se encuentran en la *cauda* epididimaria son los que se eyaculan; su transporte hasta la uretra prostática, durante la emisión seminal, está influenciado por mecanismos neuroendocrinos y quizás también por la presión ejercida debida a la gran concentración de espermatozoides ahí contenida, lo que permite la confluencia de los espermatozoides epididimarios con el plasma seminal para formar el semen que será expulsado durante la eyaculación.

6. Restablecimiento de la conducta copulatoria y del eyaculado posterior a la saciedad sexual

Se dice que la conducta copulatoria está restablecida en las ratas macho saciadas sexualmente cuando los valores de los parámetros son similares a aquellos de los no saciados (Larsson, 1956). También se indica restablecimiento copulatorio cuando los machos despliegan al menos cinco series eyaculatorias consecutivas, lo que sucede hasta los 15 días posteriores

a la saciedad sexual. Incluso, logran desplegar ocho series, a los 18-21 días subsiguientes (Beach y Jordan, 1956).

La mayoría de las ratas macho que reanudan la cópula inmediatamente después de alcanzar la saciedad sexual, realizan de una a tres series eyaculatorias (Hsiao, 1969). Sin embargo, 33% de las ratas macho ejecutan sólo una a las 24 horas de saciarse; 63% a los tres días y el 100% a los siete días (Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo, 2003). Es importante señalar que todos estos porcentajes se basan exclusivamente en el cumplimiento del patrón motor de eyaculación, sin verificar la presencia de eyaculado en los conductos femeninos.

Se sostiene que los machos son conductualmente potentes cuando fisiológicamente también lo son (Dewsbury, 1982); no obstante, esta idea es equivocada, ya que hay evidencia de que aquellos que realizan de seis a ocho series eyaculatorias tienen eyaculados con muy pocos espermatozoides y tapones seminales muy pequeños (Austin y Dewsbury, 1986).

En cuanto a la eyaculación, es común considerar que la emisión seminal debe preceder a la expulsión seminal, es decir, que la estimulación de la uretra prostática producida por la presencia de secreciones glandulares sexuales induce la segunda fase de la eyaculación. Sin embargo, la administración de monosulfato de guanetidina, que evita la emisión seminal, no incide en la ejecución del patrón eyaculatorio ni altera la actividad de los músculos bulboesponjosos, cuya contracción es requerida durante la emisión seminal (Holmes y Sachs, 1991). Este hallazgo indica que la estimulación uretral no es necesaria para provocar los patrones motores rítmicos asociados con la respuesta eyaculatoria durante la cópula (Holmes y Sachs, 1991). Las ratas macho sexualmente satisfechas pueden ser consideradas como un modelo natural a la evidencia de que la aparición de emisión seminal no es crítica para efectuar el patrón motor de eyaculación.

El costo fisiológico de la cópula repetida repercute en el eyaculado e implica la disminución drástica del peso y tamaño del tapón seminal, aunado a la ausencia de espermatozoides. La repercusión de copular

hasta la saciedad sexual abole toda expulsión (Tlachi-López *et al.*, 2012; Lucio *et al.*, 2014), que se debe a la falta de secreciones de las glándulas sexuales accesorias (Pessah y Kochva, 1975; Purvis *et al.*, 1986), sumada a la disminución drástica en la concentración de espermatozoides en el epidídimo (Austin y Dewsbury, 1986; Toner y Adler, 1986; Tlachi-López *et al.*, 2012). Por lo tanto, es de esperar que el eyaculado se restablezca gradualmente. De hecho, nuestro grupo encontró que a los cinco días post-saciedad, los machos realizan el patrón motor de eyaculación sin lograr expeler semen (Lucio *et al.*, 2014).

El eyaculado de esos mismos machos, probado a los 10 días post-saciedad, consiste en un tapón seminal de características físicas (peso y tamaño) similares al de los no saciados sexualmente, aunque el tapón no se adhiere a las paredes vaginales ni al cérvix. Esta falta de adhesión evita el transporte espermático transcervical, provocando que los espermatozoides permanezcan en la vagina (Lucio *et al.*, 2014). La fijación del tapón seminal depende de las secreciones de la próstata (Tlachi-López *et al.*, 2011), lo que hace suponer que la recuperación de la secreción prostática es más lenta que la de las seminales y coagulantes implicadas en la formación del tapón.

Dicha recuperación completa de las secreciones de las glándulas accesorias parece ocurrir a los 15 días después de la saciedad, cuando los tapones seminales están fuertemente adheridos a la vagina y facilitan el transporte de los espermatozoides. No obstante, su concentración representa una cuarta parte de la concentración espermática normal, esto es, alrededor de 6 millones de espermatozoides en lugar de 20-25 millones (Lucio *et al.*, 2014). Como ya se dijo, estos machos realizaron una serie eyaculatoria a los cinco, 10 y 15 días post-saciedad; de manera interesante, en los que eyacularon una vez hasta los 15 días después de la saciedad la concentración espermática fue de 15 millones (Lucio *et al.*, 2014). Lo anterior indica que el plasma seminal, provisto por las distintas glándulas sexuales accesorias, se recupera antes que la concentración espermática, en la que se involucran el testículo y el epidídimo (Lucio *et al.*, 2013).

7. El epidídimo y los espermatozoides

El epidídimo es un órgano de tipo compacto microtubular (de acuerdo con el criterio anatómico), de ahí que se conozca también como conducto epididimario y se divide en cuatro o más segmentos, según la especie (Setchell *et al.*, 2006; García-Lorenzana *et al.*, 2007; Cornwall, 2009). En términos generales, para la mayoría de los mamíferos se acepta la existencia de cuatro regiones anatómicas: el segmento inicial, el *caput*, el *corpus* y la *cauda* del epidídimo (Setchell *et al.*, 2006). En este trabajo concentramos nuestra atención en el *caput*, el *corpus* y la *cauda*, por ser las regiones conspicuas y claramente definidas anatómicamente. El *caput* está revestido de epitelio cilíndrico pseudoestratificado con microvellosidades, en tanto que el *corpus* y la *cauda* presentan epitelio columnar simple con microvellosidades.

En el epitelio del epidídimo se presentan distintos tipos celulares: principales, basales, apicales, estrechas, claras y halo (fig. 1). Algunos de ellos se encuentran en todas las regiones anatómicas del epidídimo (por ejemplo, las células principales), en tanto que otros son característicos de una región (por ejemplo, las células estrechas se encuentran principalmente en el segmento inicial) (Setchell *et al.*, 2006; Payal *et al.*, 2011).

Las células principales se encargan de absorber fluidos que provienen del testículo y secretan proteínas, serotonina, prostaglandinas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y electrolitos, además de intervenir en la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, reacción catalizada por la enzima 5-alfa-reductasa (Sullivan *et al.*, 2007). Las células basales controlan la secreción de electrolitos desde las células principales, mediante la liberación paracrina de prostaglandina-E2. Las células apicales y estrechas participan en la acidificación del fluido seminal, mientras que las células claras son endocíticas y pueden ser responsables de la depuración de proteínas del lumen. Las funciones inmunológicas están relacionadas con las células halo, ya que se ha demostrado por inmunocitoquímica que éstas son linfocitos T o macrófagos, de acuerdo con las condiciones de actividad reproductora.

La diversidad morfofuncional de los tipos celulares del epitelio determina las condiciones necesarias para que los espermatozoides alcancen su maduración, adquieran su motilidad, así como su habilidad para reconocer, fusionarse al ovocito y fecundarlo (Setchell *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

Es importante enfatizar que la distribución, proporción y funciones de los tipos celulares descritos difiere entre los distintos segmentos del epidídimo. Esta situación genera dominios microambientales que proveen a los espermatozoides de diferentes condiciones (nutrientes, iones y compuestos químicos) que mantienen la sobrevivencia espermática conforme recorren el órgano (Setchell *et al.*, 2006). En el epitelio epididimario se presentan diferentes tipos de uniones: ocluyentes, adherentes y comunicantes, que permiten la conformación de una barrera hemato-epididimaria, la cual además de proteger a los espermatozoides de los efectos adversos asociados con la ingesta o uso de fármacos, drogas y otros compuestos nocivos que pudieran provenir de la dieta, previene el contacto directo de las células inmunológicas con los espermatozoides, evitando así la destrucción autoinmune de los mismos (Setchell *et al.*, 2006; Cornwall, 2009; Payal *et al.*, 2011).

Además del tejido epitelial, la pared del epidídimo tiene una capa media constituida por células mioides y una capa externa denominada adventicia, formada por tejido conectivo laxo (Setchell *et al.*, 2006). En el órgano maduro, la sustancia fundamental intersticial del tejido conectivo (con sus componentes moleculares: agua, iones y proteoglicano) participa como barrera que limita la difusión de moléculas de los vasos sanguíneos que ahí se encuentran hacia el tejido epitelial (Sullivan *et al.*, 2007).

Por otro lado, el intersticio posee un elemento celular constituido por células de los linajes nervioso, neuroendocrino, vascular y fibroblástico que proveen innervación, aporte nutricional (a través de los vasos sanguíneos) y participan activamente en el control de los procesos locales de secreción, absorción y remodelación de los componentes

fibrilares y de la matriz extracelular. Mención especial merecen los mastocitos, células provenientes de la médula ósea, particularmente abundantes en el epidídimo y que al parecer están involucrados en los procesos de remodelación tisular que ocurren durante el ciclo de involución-recrudescencia que se presenta en el testículo y epidídimo de los mamíferos con reproducción de tipo estacional (Setchell *et al.*, 2006; Cornwall, 2009; Amann *et al.*, 1993).

Es importante destacar que el tiempo que los espermatozoides requieren para recorrer la extensión céfalo-caudal del epidídimo varía entre especies, en la rata es de entre ocho y 12 días, dependiendo de la cepa. Cabe recordar que la principal fuerza de propulsión de los espermatozoides dentro de la luz del epidídimo es de origen neuromuscular, supeditada a las contracciones rítmicas espontáneas generadas en la pared del epidídimo en respuesta a los andrógenos, la modulación intrínseca de las neuronas, la actividad nerviosa del hipogástrico y a la acción de diversos neurotransmisores sobre las células mioideas del epidídimo (Sullivan *et al.*, 2007; Setchell *et al.*, 2006; Robaire *et al.*, 2006). Es por ello que los espermatozoides que se eyaculan son aquellos que se encuentran en el epidídimo, particularmente en la *cauda* (Setchell *et al.*, 2006). Cuando abandonan el testículo, aún no son capaces de fertilizar al ovocito, adquieren esta capacidad durante su paso por el epidídimo, proceso en el que son necesarios los andrógenos, responsables de mantener la estructura y función del epidídimo (Robaire y Hamzeh, 2011; Seenundun y Robaire, 2007). Inmediato a la saciedad sexual, la testosterona sérica aumenta significativamente; sin embargo, se restablece al nivel basal 24 horas después de la saciedad (3.97 ± 1.03 ng/ml) (Bonilla *et al.*, 2006), y así se mantiene a las 48 h (2.03 ± 0.28 ng/ml), 72 h (3.80 ± 0.86 ng/ml) y siete días post-saciedad sexual (2.28 ± 0.37 ng/ml) (Romano *et al.*, 2006). Se desconoce si el epidídimo sufre cambios morfológicos, así como los niveles de testosterona local posterior a la saciedad sexual (Robaire *et al.*, 2007; Hamzeh y Robaire, 2009).

8. Maduración espermática epididimaria

En el epidídimo ocurre la maduración espermática, que se define como los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que suceden en los espermatozoides, y que les confieren la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal y fertilizar al ovocito. La maduración espermática se logra cuando acontece la migración de los espermatozoides desde el *caput* hasta la *cauda* del epidídimo (Cooper y Ching, 2006); entre los cambios que ocurren se encuentra la movilidad progresiva que adquieren los espermatozoides durante el paso por este órgano (Robaire *et al.*, 2006); por ejemplo, en los roedores, la movilidad espermática la obtiene el mayor porcentaje de espermatozoides en el *caput*, más que en otras regiones del órgano (Avilés, 2011).

Todas estas transformaciones son necesarias para adquirir el potencial de procesos esenciales para la fertilización, como la capacitación y la reacción acrosomal, que ocurren en el tracto reproductor femenino. Como se ha mencionado, los procesos involucrados en la maduración de los espermatozoides incluyen eventos bioquímicos que requieren la presencia de componentes secretados por los diferentes tipos celulares epiteliales, por ejemplo, secretan proteínas que permiten la maduración espermática (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Dos de los procesos esenciales requeridos son los cambios en la membrana plasmática: la glicosilación (Jiménez y Merchant, 2003) y la fosforilación (Lewis y Aitken, 2001; Rodríguez-Tobón *et al.*, 2015).

La glicosilación proteica es la adición de carbohidratos a una proteína que formará parte de la superficie celular, sirve de indicador para determinar su distribución intracelular y su lugar final de funcionamiento, incluyendo el patrón de secreción en el caso de que su desempeño lo ejerza fuera de la célula (Rosado, 2000); en el espermatozoide, las glicoproteínas, carnitinas y glicerofosfolina se integrarán a la membrana plasmática (Avilés, 2011; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011), permitiendo la interacción espermatozoide-óvulo.

En tanto que la fosforilación es la adición de un grupo fosfato, se trata del mecanismo básico de transporte de energía, así como la regulación de proteínas y enzimas mediante modificaciones post-traduccionales (Laserna, 2009). La fosforilación de las proteínas es importante en la transducción de señales extracelulares, el transporte intracelular y la progresión del ciclo celular; se regula por la actividad de las proteínas-cinasas y fosfatasas, permitiendo a las células activar o no la función de otras proteínas. Esta fosforilación ocurre en los residuos de serina, treonina y tirosina de las proteínas, siendo la fosforilación de la tirosina la más importante; en los espermatozoides se asocia con las proteínas flagelares, ya que juegan un papel importante en los cambios de movilidad (Avilés, 2011; Laserna, 2009). Estos procesos intracelulares involucrados en la maduración espermática no han sido estudiados en los machos con saciedad sexual, ni en el periodo post-saciedad que incluya hasta la recuperación morfofuncional del epidídimo y, consecuentemente, la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

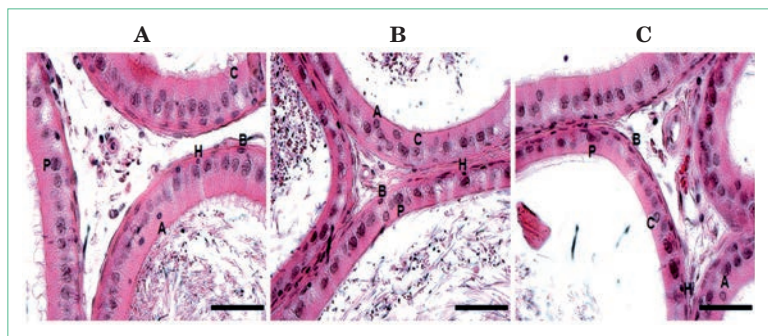
9. Morfofisiología del epidídimo en la saciedad sexual

Se mencionó previamente que después de la saciedad sexual, la testosterona sérica no se modifica (Romano *et al.*, 2006), por lo que surge la duda de qué ocurre con la morfofisiología del epidídimo después de la saciedad sexual. Nuestro grupo de trabajo analizó los diferentes parámetros de la morfología epididimaria (citología de las células, tipo de epitelio, conteo celular y morfometría) y de los parámetros espermáticos (viabilidad, concentración y morfología) de machos del grupo control inmediato a la saciedad sexual, a los cuatro, ocho, 12, 16, 20, 24 y 28 días posteriores a la saciedad sexual; se encontró que el peso del epidídimo en sus diferentes regiones, así como las características citológicas estructurales, bioquímicas y funcionales de los tipos celulares que conforman el epitelio epididimario, presentan variaciones (en la afinidad a los colorantes empleados en el análisis histológico, en

la forma de las células, tipos celulares y altura del epitelio) que denotan cambios en la actividad de síntesis y secreción de los productos celulares.

Entre las modificaciones celulares más importantes están aquellas implicadas en la maduración espermática, lo cual explica que en el periodo posterior a la saciedad se observan cambios en la concentración, viabilidad y morfología espermática que pueden ser provocados por alteración en la concentración de andrógenos intraepididimarios, así como por la actividad de enzimas, como la aromatasa, y de los receptores a andrógenos presentes en las células del epitelio epididimario e incluso por la inervación de los componentes tisulares de la pared de los conductos epididimarios.

Figura 1. Fotomicrografías de cortes transversales de: **A)** *caput*, **B)** *corpus* y **C)** *cauda* del epidídimo de rata. Se observan los diferentes tipos celulares, en los que se nota la basofilia y acidofilia. Las letras representan los tipos celulares: P: principales, B: basales, A: apicales, C: claras y H: halo (H-E, barras y aumento original: 500 μ m y x400).



Referencias

- Amann, R., Hammerstedt, R y Veeramachaneni, R. (1993). The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 5, 361-381.
- Austin, D. y Dewsbury D. (1986). Reproductive capacity of male laboratory rats. *Physiology & Behavior*, 37, 627-632.
- Avilés, K. G. (2011). Efecto de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. Disertación de Doctorado. Universidad de Murcia, España.
- Beach, F. y Jordan, L. (1956). Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 8, 121-133.
- Bermant, G. (1976). Sexual Behavior: Hard Times with the Coolidge Effect. En M. Siegel y P. Zeigler (eds.), *Psychological Research: The Inside Story* (76-105). New York: Harper & Row.
- Blandau, R. (1945). On the factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 77, 253-272.
- Bonilla, H., Gonzalo Vázquez, M. y Retana, S. (2006). Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Hormones and Behavior*, 44, 376-382.
- Cooper, T. y Ching-Hei, Y. (2006). Sperm maturation in the human epididymis. En Ch. De Jonge y Ch. Barratt (eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization and Regeneration* (pp. 72-107). New York: Cambridge University Press-UK.
- Cornwall, G. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15, 213-227.
- Clément, P. y Giuliano, F. (2011). Physiology of ejaculation. En J. Mulhall, L. Incrocci, I. Goldstein y R. Rosen (eds.), *Cancer and Sexual Health, Current Clinical Urology* (pp. 77-89). New England: Humana Press.
- Dewsbury, D. (1982). Ejaculate costs and mate choice. *The American Naturalist*, 119, 601-610.
- Eguibar, J.R., Cortés, M.C. y Adams, N. (2013). Control fisiológico de la conducta sexual, la erección y la eyaculación. En Y. Cruz y J.R. Eguibar (eds.), *Aparato urogenital: de la Biología a la Fisiopatología* (pp. 129-144). México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Fernández, A. y Rodríguez, G. (2003). Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scandinavian Journal Psychology*, 44, 257-263.
- García, M., López, R. Gómez, C. y Uribe, M.C. (2007). A Light and scanning electron microscopic study of the epididymis active state of endemic Mexican rodent *Peromyscus winkelmani* (Carleton) (Rodentia: Muridae). *Anat Histol Embryol*, 36, 230-240.

- Hamzeh, M. y Robaire, B. (2009). Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal Andrology*, 30(2), 200-212.
- Holmes, G. y Sachs, B. (1991). The ejaculatory reflex in copulating rats: normal bulbospongiosus activity without apparent urethral stimulation. *Neuroscience Letters*, 125(2), 195-197.
- Hsiao, S. (1969). The Coolidge effect in male rat copulatory behaviour: failure to replicate Fisher's results. *Psychonomic Science*, 14(1), 1-2.
- Jiménez, L.F. y Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat*. England: Almquist & Wiksell.
- Larsson, K. y Swedin, G. (1971). The sexual behavior of male rats after bilateral section of the hypogastric nerve and removal of the accessory genital glands. *Physiology and Behavior*, 6, 251-253.
- Laserna, E.J. (2009). Cambios en la fosforilación de proteínas nucleares y cascadas de señalización inducidos por el ácido retinoico. Disertación de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biomedicina. Valencia, España.
- Lewis, B. y Aitken, J. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology Reproduction*, 64, 1545-1556.
- Lucio, R.A., Rodríguez, V., Tlachi, J.L., García, M. y Fernández, A. (2014). Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology*, 2, 450-457.
- Lucio, R. A., Tlachi, J.L. y Rodríguez, V. (2014). Conducta sexual masculina: cópula y saciedad. En M. Matínez, R.A. Lucio y J. Rodríguez (eds.), *Biología del comportamiento: aportaciones desde la Fisiología* (pp. 113-124). México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Lucio, R. A., Tlachi, J.L., Fuentes, A.L., Jiménez, F. y Gutiérrez, G. (2013). Anatomía urogenital masculina: una perspectiva eco-morfofisiológica. En Y. Cruz y J.R. Eguibar (eds.), *Aparato urogenital: de la Biología a la Fisiopatología* (pp. 59-88). México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Matthews, M. y Adler, N. (1977). Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *Journal Comparative and Physiological Psychology*, 91, 727-741.
- McGlynn J.M. y Erpino, M. (1974). Effects of vasectomy on the reproductive system and sexual behavior of rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40, 241-247.
- Payal, M., Thomas Hinton, B. y Dufour, J. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction*, 84, 851-858.
- Pessah, H. y Kochva, E. (1975). The secretory activity of the seminal vesicles in the rat after copulation. *Biology of Reproduction*, 13(5), 557-560.
- Phillips, B. y Fernández, A. (2009). Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 442-455.
- Pollak, E. y Sachs, B. (1976). Penile movements and the sensory control of copulation in the rat. *Behavioral Biology*, 117(2), 177-186.

- Purvis, K., Haug, E., Thomassen, Y., Mevag, B. y Rui, H. (1986). Short-term effects of mating on the accessory sex glands of the male rat. *Journal of Reproduction & Fertility*, 77, 373-380.
- Robaire, B., Hinton, B. y Orgebin, M.C. (2006). The epididymis. En E. Knobil y J. Neill (eds.), *Physiology of Reproduction* (pp. 1071-1148). Australia: Elsevier.
- Robaire, B., Seenundum, S., Hamzeh, M. y Lamour, S.A. (2007). Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian Journal Andrology*, 9(4), 545-553.
- Robaire, B. y Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal Andrology*, 32(6), 592-599.
- Rodríguez, G. y Fernández, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioural Brain Research*, 62, 127-134.
- Rodríguez, G., Guadarrama, I.L. y Morales, A. (2011). Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: two expressions of the same process? *Behavioural Brain Research*, 217, 253-260.
- Rodríguez, A., Fierro, R., León, M.A., Rosado, A., Cortés, E. y Arenas, E. (2015). Tyrosine phosphorylation as evidence of epididymal cauda participation in the sperm maturation process of *Corynorhinus mexicanus* bat. *Acta Zoologica*, 97, 310-318.
- Romano, M., Phillips, B., Chavira, R., Rodríguez, G. y Fernández, A. (2006). Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinology*, 85, 16-26.
- Rosado, A. (2000). *Introducción a la Glicobiología*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Seenundun, S. y Robaire, B. (2007). Time-dependent rescue of gene expression by androgens in the mouse proximal caput epididymidis-1 cell line after androgen withdrawal. *Endocrinology*, 148(1), 173-188.
- Setchell, B.P., y Breed, W.G. (2006). Anatomy, vasculature, and innervations of the male reproductive tract. En E: Knobil y J. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 771-826). Australia: Elsevier.
- Sullivan, R., Frenette, G. y Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal Andrology*, 9(4), 483-91.
- Tlachi, J.L., Eguibar, J., Fernández, A. y Lucio, R.A. (2012). Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiology Behavior*, 106, 626-630.
- Tlachi, J.L., López, A., Hoffman, K., Velázquez, J., García, M. y Lucio, R.A. (2011). Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biological Research*, 44, 259-267.
- Toner, J. y Adler, N. (1986). The pre-ejaculatory behavior of male and female rats affects the number of sperm in the vagina and uterus. *Physiology & Behavior*, 36, 363-367.
- Wilson, J., Kuehn, R. y Beach, F. (1963). Modification in the sexual behavior of male rats produced by changing the stimulus female. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 56(3), 636-644.

Glosario

- Aminoácidos:** moléculas que contienen un grupo amino en uno de los extremos y un grupo ácido carboxílico en el otro extremo. Son las unidades que forman a las proteínas.
- Bulboesponjoso:** músculo cuyas fibras se originan en el bulbo peneano (tejido eréctil de la raíz del pene) y se insertan en el cuerpo esponjoso del mismo (tejido eréctil del cuerpo del pene). Se trata de un músculo par.
- Carbohidratos:** biomoléculas más abundantes compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Funcionan como fuente de energía, también como unidades estructurales y son precursores de la síntesis de otras biomoléculas.
- Células mioides:** unidades morfológicas y funcionales que rodean los túbulos seminíferos provocando contracciones rítmicas peristálticas que facilitan el paso de los espermatozoides y los fluidos testiculares a través de los túbulos seminíferos.
- Cópula:** conjunto de patrones motores acompañados de respuestas genitales que culminan con la eyaculación.
- Cuello vesical:** conjunto de músculos que unen la vejiga urinaria con la uretra, se contraen para mantener la continencia urinaria y se relajan durante el reflejo de micción.
- Dihidrotosterona:** metabolito activo biológico de la testosterona, también llamada hormona androgénica, sintetizada por los testículos y la próstata, principalmente. Su mayor contribución sucede en el desarrollo de las características sexuales masculinas.
- Fosforilación:** síntesis de ATP (adenosín trifosfato) a partir de ADP (adenosín difosfato) y fosfato para la obtención de energía.
- Glándulas sexuales accesorias:** órganos anatómicamente asociados al aparato reproductor masculino que sintetizan las secreciones que forman el plasma seminal.
- Glicosilación:** proceso de adición de carbohidratos a una proteína que constituirá parte de la membrana celular. En el espermatozoide, las glicoproteínas, carnitina y glicerofosfolina se integran a la membrana.
- Hipogástrico:** región del abdomen localizada debajo de la zona umbilical y entre las fosas ilíacas.
- Meato uretral:** orificio en el extremo libre del pene por donde se expelen orina y semen.
- Microtúbulos:** componentes internos del citoesqueleto de las células eucariontes, formados por dímeros de alfa y beta tubulina. En las células ciliadas y flageladas participan en su función.
- Monosulfato de guanetidina:** fármaco adrenérgico que previene la fase de emisión seminal.
- Mucosa uretral:** capa de tejido epitelial y conjuntivo que reviste las paredes internas de la uretra.
- Paracrina:** comunicación química entre células de proximidad inmediata, pero de diferente estirpe celular.
- Patrón motor:** movimiento estereotipado fácilmente identificable que puede ser registrado y cuantificado.
- Periné:** región anatómica donde se encuentran los orificios de salida

del sistema urogenital y digestivo, también conocido como piso pélvico.

Prostaglandinas: moléculas de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos, que constituyen una familia de mediadores celulares con efectos diversos, a menudo contrapuestos.

Próstata: glándula sexual accesorio que se localiza en la base de la vejiga urinaria, rodeando la porción proximal de la uretra. Provee zinc y fructosa, necesarios para la movilidad espermática.

Proteína cinasa: enzima transductora de señales celulares y/o tisulares que modifica a otras moléculas (proteínas) mediante la fosforilación.

Serotonina: neurotransmisor que se sintetiza principalmente en

los núcleos del rafe del tronco cerebral, los cuales se proyectan a distintas áreas cerebrales y médula espinal. Regula algunas funciones sensoriales, motoras y de comportamiento en los mamíferos.

Testosterona: andrógeno sintetizado a partir del colesterol por las células de Leydig del testículo; también se sintetiza en la corteza adrenal y en el ovario. Tiene acciones sexuales sobre la hipófisis, y metabólicas y estimulantes sobre la eritropoyesis y antineoplásicas.

Transcervical: que cruza el cérvix de la vagina hacia el útero.

Uretra prostática: porción de la uretra rodeada por la glándula prostática.

COMPARACIÓN DE LA CONSERVACIÓN *IN* *VITRO* Y CAPACIDAD FERTILIZANTE *IN VIVO* DEL SEMEN DE CONEJO REFRIGERADO CON DOS DILUYENTES

Marcela Hernández Ramírez,^{1*}
Juan Gabriel Rivera Martínez,¹
Yazmín Elizabeth Felipe Pérez² y
Jorge Antonio González Santos³

¹Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

²Departamento de Reproducción Animal, Universidad Autónoma del Estado de México.

³Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco.

1. Introducción

En México, la actividad cunícola ha tenido un desarrollo limitado (Torres, 2012). En 2001, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) reconoció de manera oficial a la cunicultura como actividad ganadera y el Sistema Nacional de Información inició el registro estadístico de esta ocupación productiva. La investigación en la cunicultura ha sido escasa en el país y se ha realizado de manera desarticulada y dispersa; además de no aprovechar los beneficios biológico-económicos que ofrece la especie, como elevada prolificidad, ciclo reproductivo corto y amplio grado de diversidad genética (Lavara *et al.*, 2003). Por tanto, la inseminación artificial (IA) ofrece ventajas de manejo, ya que permite sincronizar partos de un gran número de animales usando un mínimo número de sementales, disminuye el riesgo de propagación de enfermedades y permite la utilización de semen refrigerado (Bilbao, 1996). Uno de los factores más importantes involucrados en la IA es el medio en el que se diluye el semen (Castellini, 1996), el cual permitirá mantener una mayor proporción de espermatozoides vivos hasta el momento de la inseminación (Vega *et al.*, 2012). A diferencia de otras especies, los espermatozoides de conejo presentan una baja permeabilidad al agua y un alto coeficiente de activación de energía, razones por las cuales la supervivencia espermática resulta inferior al utilizar técnicas como la criopreservación. Por tanto, la conservación de semen de conejo mediante

refrigeración constituye una estrategia oportuna para alargar la vitalidad espermática, reduciendo la alteración de la funcionalidad y pérdida de la vitalidad al ser sometidos al proceso congelación/descongelación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos diluyentes para la refrigeración (5°C) seminal durante 24 horas sobre la calidad espermática del conejo y los parámetros de fertilidad y prolificidad de las hembras inseminadas artificialmente con el semen refrigerado.

2. Material y métodos

Se utilizaron conejos blancos de raza Nueva Zelanda. Para obtener los eyaculados se utilizó una vagina artificial (VA) tipo francés, a una temperatura de 45°C (Lavara *et al.*, 2013). Posteriormente se trasladó en un termo a una temperatura de 38°C al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

2.1 Evaluación seminal

Las muestras fueron colocadas en baño María (38°C). Se evaluó la movilidad masal usando una escala de 0 a 5, donde 0 indica ausencia de movimiento y 5 ondas espermáticas rápidas apreciables. Para ello, se colocaron 5 µl de muestra en un portaobjetos y se analizó bajo el microscopio óptico con objetivo 10X. Para la movilidad progresiva se colocaron 5 µl de muestra en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos, examinando con objetivo 20X, valorando el porcentaje de espermatozoides que mostraron movimiento progresivo. Para determinar el porcentaje de vitalidad y morfología se utilizó la tinción eosina-nigrosina, con la que los espermatozoides vivos no se tiñen y los muertos presentan coloración rosácea. En cuanto a la morfología, se categorizaron como normales o anormales cuando presentaron irregularidades de cabeza, pieza media y cola. La concentración espermática se calculó utilizando la cámara Neubauer, para ello se realizó una dilución

de 995 μ l de agua destilada y 5 μ l de semen, colocando 15 μ l de la dilución en cada una de las secciones de la cámara y se evaluó al microscopio con objetivo 40X. El resultado se expresó en millones de espermatozoides por mL ($X10^6$ /mL). Se revisó el estado del acrosoma, colocando 10 μ l de la muestra espermática con medio Tris y 10 μ l de preparación de Clortetraciclina (CTC), haciendo un extendido sobre un portaobjetos previamente temperado a 37°C. Se observó la muestra con un aumento de 100X, y se le agregó una gota de aceite de inmersión para ayudar a un mejor enfoque. Por medio de la fluorescencia emitida por la CTC se determinaron los patrones y el estado acrosomal, donde: patrón F= espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto, patrón B= espermatozoides capacitados con acrosoma intacto y patrón RA= espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

2.2 Procesamiento y evaluación de las muestras

El volumen de cada uno de los eyaculados se dividió en dos alícuotas, cada una se diluyó en una proporción 1:1 (semen/Tris, v/v) en Tris-yema de huevo (TY) y Tris-leche descremada (TL), utilizando tubos eppendorf de 1 mL. Inmediatamente después fueron puestas en refrigeración a 5°C, durante 24 horas. La velocidad de enfriamiento desde la temperatura ambiente a 5°C fue de 0.68°C/ min. La determinación de movilidad progresiva, vitalidad y morfología se realizó a las dos, cuatro, seis, ocho, 12 y 24 horas post-refrigeración y la determinación del estado del acrosoma se llevó a cabo a las dos, ocho y 24 horas post-refrigeración para ambos diluyentes utilizados.

2.3 Inseminación artificial

Las hembras fueron expuestas a un cambio súbito de ambiente (cambio de jaula) ocho horas antes de la inseminación artificial, con el propósito de sincronizar el celo. Posteriormente se les colocó en un cañón (dispositivo de apoyo y sujeción), dentro del cual se les introduce dejando expuestos los miembros posteriores

y el área genital para facilitar el procedimiento de inseminación (Alvaríño, 2009). Se depositaron 0.5 ml por dosis de los medios utilizados (TY y TL) a diferentes tiempos post-refrigeración (dos, ocho y 24 horas, además del control). Inmediatamente después se aplicaron 25 UI de un análogo de GnRH para inducir la ovulación (Fertagyl®). El número de hembras inseminadas fue de cinco para cada uno de los medios y tiempos establecidos (n=35).

2.4 Análisis estadístico

Los parámetros de calidad espermática (movilidad progresiva, vitalidad, morfología normal e integridad acrosomal) se compararon entre tratamientos mediante un ANOVA, utilizando el paquete estadístico NCSS. Un valor de P menor de 0.05 ($P < 0.05$) se consideró significativo.

3. Resultados

De los eyaculados recolectados en fresco se obtuvo un volumen de 0.47 ± 0.21 ml, movilidad masal de categoría 4, movilidad progresiva de $85 \pm 4\%$, vitalidad de $88 \pm 5\%$, morfología normal de $71 \pm 7.13\%$ y una concentración de 283.81 ± 103.22 106/ml. Parámetros de movilidad progresiva, vitalidad y morfología normal hacia las 24 horas post-refrigeración con ambos diluyentes (cuadro 1). La integridad del acrosoma hacia las dos, ocho y 24 horas post-refrigeración se indican en el cuadro 2. En el cuadro 3 se muestra el comportamiento reproductivo en conejas inseminadas con semen fresco y semen refrigerado hacia las 24 horas, utilizando ambos diluyentes.

4. Discusión

La movilidad, vitalidad, morfología e integridad de las membranas plasmática y acrosomal son parámetros de la función espermática directamente relacionados con la capacidad fertilizante y que se modifican

con la refrigeración a largo plazo. En este trabajo logró observarse una disminución en la movilidad progresiva a partir de las 12 y hasta las 24 horas post-refrigeración entre diluyentes. Estudios previos han demostrado un efecto protector proporcionado por la yema de huevo sobre este parámetro en diversas especies (Crespilho *et al.*, 2014; Allai *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2006). En relación con la vitalidad y morfología normal no se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) tanto en el tiempo de conservación como entre los diluyentes respecto del control. Rosato *et al.* (2006) reportan 65% de vitalidad en espermatozoides refrigerados de conejo utilizando un diluyente comercial (Lepus) hacia las 24 horas de refrigeración, evidenciando un resultado inferior acerca de ambos diluyentes utilizados en este estudio (TY $79 \pm 10.91\%$ y TL $75.57 \pm 11.87\%$). Este mismo comportamiento también se observó para el parámetro de morfología normal espermática. Los resultados obtenidos en este estudio con el diluyente TL fueron inferiores a los alcanzados con el diluyente TY. Pese a la amplia utilización de leche descremada de manera convencional como componente en la conservación de semen (Salamon y Maxwell, 2000), actualmente el mecanismo de acción por el cual este líquido ejerce un efecto protector no se ha esclarecido en su totalidad, aunque se han propuesto varios mecanismos (Bergeron y Manjunath 2006). Los resultados de integridad acrosomal en este trabajo reportan que para las ocho y 24 horas post-refrigeración los espermatozoides conservados con el diluyente TY registraron mayores porcentajes de integridad en su acrosoma (espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto), mostrando 61.83% y 59.17%, respectivamente, en comparación con 56.17% (ocho horas) y 50.5% (24 horas) correspondientes al diluyente TL. No obstante, hacia las dos primeras horas post-refrigeración el comportamiento entre diluyentes se presentó sin cambios. Estos resultados se encuentran muy por encima de los obtenidos por Crespilho *et al.* (2014), quienes reportaron 4.0% de acrosoma intacto en espermatozoides de bovino refrigerado (5°C) hacia las 24 horas, utilizando un diluyente a base de Tris-yema de huevo-fructosa. Los parámetros reproductivos de hembras

inseminadas artificialmente reflejaron un comportamiento independiente respecto del tiempo en refrigeración y tipo de diluyente, excepto con TY, que mostró una disminución en el porcentaje de fertilidad conforme incrementa el tiempo en refrigeración. Entre algunos factores que intervienen de manera directa sobre los resultados, y en lo que respecta a la hembra, se encuentran el estado o condición fisiológica y edad de vida reproductiva (Castellini y Lattaioli, 1999); además de otros relacionados directamente con la técnica de IA, como es el método de inducción de celo e inducción a la ovulación (García y Rodríguez, 2002) y número de espermatozoides por dosis (Roca *et al.*, 2000). Dixson y Anderson (2004) mencionan también que el tracto reproductor de la hembra es el que dispone el ambiente en que los espermatozoides tendrían que competir por fecundar sus ovocitos.

Los efectos favorables de la yema de huevo y la leche descremada para contrarrestar las alteraciones provocadas por el choque de frío se encuentran ampliamente comprobados en la refrigeración del semen en diferentes especies domésticas. Sin embargo, los complejos mecanismos relacionados con esta protección aún son objeto de investigación. Nuestros resultados reafirman la importancia que tiene la adición de la yema de huevo y la leche descremada al diluyente de conservación en refrigeración del semen de conejo, dado los beneficios en la preservación de la movilidad, la estabilización de la membrana plasmática y acrosomal, los cuales demostraron ser suficientes para lograr la fertilización. No obstante, estudios posteriores deberán contemplar factores de relación directa con los parámetros evaluados en este trabajo, como raza, estacionalidad reproductiva, línea genética, condición fisiológica, así como el estudio de diferentes componentes del diluyente de conservación seminal. Lo anterior, con el propósito de mejorar el mantenimiento y la funcionalidad de la célula espermática, además de preservar el potencial de fertilización de los espermatozoides bajo protocolos ya sea de refrigeración o de congelación, con la finalidad de transmitir a futuras poblaciones cunícolas características reproductivas y productivas competitivamente deseables.

5. Conclusión

La tolerancia del semen de conejo a la conservación a 5°C hasta 24 horas, medida en términos del mantenimiento de los parámetros básicos de calidad espermática (movilidad, vitalidad, morfología) e integridad acrosomal, está influida por el diluyente utilizado. No obstante, la yema de huevo en su composición presenta un mejor desempeño en relación con el mantenimiento de los estándares básicos de calidad espermática respecto del diluyente a base de leche descremada. Sin embargo, los niveles reproductivos en hembras inseminadas artificialmente con semen refrigerado muestran un comportamiento independiente acerca del tiempo de conservación y diluyente empleado. Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo se aconseja usar yema de huevo y leche descremada como importantes componentes del diluyente de conservación para las dosis de semen de conejo refrigerado, a las 24 horas a emplear en la inseminación artificial.

Cuadro 1. Movilidad progresiva, vitalidad y morfología normal hacia las 24 horas post-refrigeración con los diluyentes TY y TL.

Parámetros de calidad espermática (%)				
Tiempo (horas) normal	Diluyente	Movilidad progresiva	Vitalidad	Morfología
0	TRIS	87.5 ± 4.63	85.13 ± 4.88	73.38 ± 4.50
2	TY	80 ± 7.56	84.88 ± 5.33	70.38 ± 5.01
	TL	80 ± 9.26	81.13 ± 15.56	63.75 ± 6.36
4	TY	77.50 ± 7.07	83.25 ± 8.91	70.12 ± 7.62
	TL	72. ± 10.35	80.63 ± 12.94	64.13 ± 9.61
6	TY	73.71 ± 7.87	83.14 ± 7.22	70.86 ± 9.51
	TL	65.71 ± 12.72	76.71 ± 10.72	63 ± 6.78
8	TY	70 ± 5.77	81.57 ± 8.26	66 ± 11.53
	TL	50 ± 18.26 ^a	74.71 ± 15.50	59.57 ± 9.32
12	TY	47.50 ± 11.64 ^b	81.50 ± 5.31	66.37 ± 5.12
	TL	40 ± 15.11 ^b	75.62 ± 6.94	60.12 ± 6.68
24	TY	44.29 ± 12.88	79 ± 10.91	65.29 ± 9.27
	TL	24.29 ± 21.49 ^c	75.57 ± 11.87	61.14 ± 9.19

Cuadro 2. Integridad del acrosoma hacia las 24 horas post-refrigeración con los diluyentes TY y TL.

Tiempo	0 Horas	2 Horas		8 Horas		24 Horas	
Medio	Tris	TY	TL	TY	TL	TY	TL
Intactos	76 ± 3.63 ^a	63.33 ± 5.72 ^a	66.50 ± 5.39 ^a	61.83 ± 3.87 ^a	56.17 ± 6.11 ^a	59.17 ± 2.93 ^a	50.50 ± 6.47 ^a
Capacitados	17.5 ± 3.21 ^{ab}	21.33 ± 4.93 ^{ab}	18.00 ± 3.94 ^{ab}	25.67 ± 8.76 ^{ab}	22.33 ± 6.19 ^{ab}	25.87 ± 3.67 ^{ab}	26.50 ± 1.87 ^{ab}
Reaccionados	6.5 ± 1.87 ^c	15.00 ± 5.18 ^c	16.83 ± 4.17 ^{cd}	17.00 ± 5.37 ^c	21.67 ± 3.98 ^{cd}	18.00 ± 5.22 ^c	22.90 ± 6.65 ^{cd}

Cuadro 3. Efecto del tipo de preservación de semen y diluyente sobre parámetros reproductivos en conejas primíparas inseminadas artificialmente. TR= Tiempo de refrigeración. TY= Diluyente Tris + yema de huevo. TL= Tris + leche descremada. DG+= Diagnóstico de gestación positiva. F= Fertilidad. GNT= Gazapos nacidos totales. TPC= Tamaño promedio de camada. PPC= Peso promedio de camada.

Inseminación		Parámetros reproductivos				
T.R (Horas)	Diluyente	DG + (n)	F (%)	GNT (n)	TPC(n) ± SEM	PPC(g) ± SEM
0	Tris	5	100	28	5.6 ± 2.5	0.347 ± 0.142
2	TY	4	80	17	5.6 ± 2.9	0.212 ± 0.103
	TL	2	40	12	6 ± 2.8	0.322 ± 0.081
8	TY	3	60	25	8.3 ± 3.1	0.427 ± 0.050
	TL	5	100	25	5 ± 3.7	0.548 ± 0.244
24	TY	2	40	12	4 ± 2.8	0.249 ± 0.142
	TL	2	40	17	8.5 ± 2.1	0.500 ± 0.084

Referencias

- Allai, L., Druart, X., Contell, J., Louanjli, N., Ben Moula, A., Badi, A., Essamadi, A., Nasser, B. y El Amiri, B. (2015). Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal Reproduction Science*, 160, 57-67.
- Bergeron, A. y Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1338-1344.
- Bilbao, M. (1996). Manejo en inseminación artificial: factores que afectan a la calidad seminal y al índice de fertilidad. *Boletín de Cunicultura*, 85, 1-22.
- Castellini, C. (1996). Recientes avances en la inseminación artificial en conejos. Ponencia presentada en el 6th Congreso Mundial de Cunicultura, octubre 11-14. Toulouse, España.
- Crespilho, A. M., Nichi, M., Dell'aqua, J. A. y Ozunam, F. (2014). Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, 146, 126-133.
- Dixon, A. y Anderson, M. (2004). Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiology and Behavior*, 83, 361-71.
- El-Kelawy, H., Tawfeek, M., El-Gaafary, M. e Ibrahim, H. (2012). Viability and fertilizing ability of extended rabbit semen stored at 5°C. Ponencia presentada en el 10th Congreso Mundial de Cunicultura, septiembre 3-6. Sharm El- Sheikh, Egipto.
- Lavara, R., Mocé, E. y Vicente, S. (2003). Buenas Prácticas en Inseminación Artificial I: Preparación de Dosis Seminales. *Boletín de Cunicultura*, 128, 14-23.
- Lavara, R., David, I., Mocé, E., Baselga, M. y Vicente, S. (2013). Environmental and male variation factors of freezability in rabbit semen. *Theriogenology*, 79, 582-589.
- Maertens, L. y Luzi, F. (1995). Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedules. *World Rabbit Science*, 3(1), 27-34.
- Roca, T., Martínez, S., Vázquez, J. y Martínez, E. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 64, 103-112.
- Rosato, M., Rebollar, P., y Iaffaldano, N. (2006). Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. Ponencia presentada en el XXXI Simposio de Cunicultura, mayo 19 y 20. Valladolid, España.
- Sánchez, A., Cartagena, A. y Berland, M. (2006). Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 17(1), 1-7.

- Salamon, S. y Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Torres, G. (2012). Aceptación y disponibilidad a pagar de los consumidores por la carne de conejo. Disertación de maestría, Colegio de Postgraduados, México.
- Vega, M., Barrio, M., Quintela, L., Becerra, J., Cainzos, J., Prieto, A., Rodríguez-Zamora, A. y Herradón, P. (2012). Evolución del manejo reproductivo en cunicultura. *Información técnica económica agraria*, 10(2), 172-190.

La presente edición de
El espermatozoide: una mirada desde México
se concluyó en enero de 2019.
Revisión y cuidado editorial: Andrea López Monroy.
Diseño y maquetación: Luis G. Vázquez Moctezuma.
Servicios editoriales Scriptus.
El tiraje consta de 100 ejemplares y en su
composición se utilizó la familia
tipográfica New Century Schoolt.

Para la mayoría de las personas el espermatozoide es “la otra célula que participa en la reproducción”. Para quienes escribimos en el presente volumen es “una célula única, con características fascinantes que atrapa nuestra atención y nos mantiene eternamente asombrados”. Deseamos que este libro le permita al lector conocer algunas de las contribuciones que hacemos desde México para ampliar el conocimiento sobre el gameto masculino.

Los artículos que aquí se reúnen derivan de las Jornadas Estatales de Reproducción que iniciaron en el año 2010 –y cuya realización continúa a la fecha– por iniciativa de los grupos de investigación Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide de la UAM-Iztapalapa y de los miembros del Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA) de la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, con el objetivo de abrir un foro crítico que permitiera a los estudiantes expresarse con toda libertad y con ello construir conocimientos sólidos. Este foro ha crecido año con año, incluyendo talleres que han abordado desde temas prácticos de campo, como la inseminación artificial y la transferencia de embriones en ovinos y caprinos, hasta la evaluación y congelación de semen en el laboratorio.

