

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Efecto de la osmolalidad sobre la habilidad fecundante del espermatozoide humano: un modelo de estudio *in vitro*

Autor: Mg. Adriana María Caille

Directora de Tesis: Dra. María José Munuce

Laboratorio de Estudios Reproductivos

Área Bioquímica Clínica

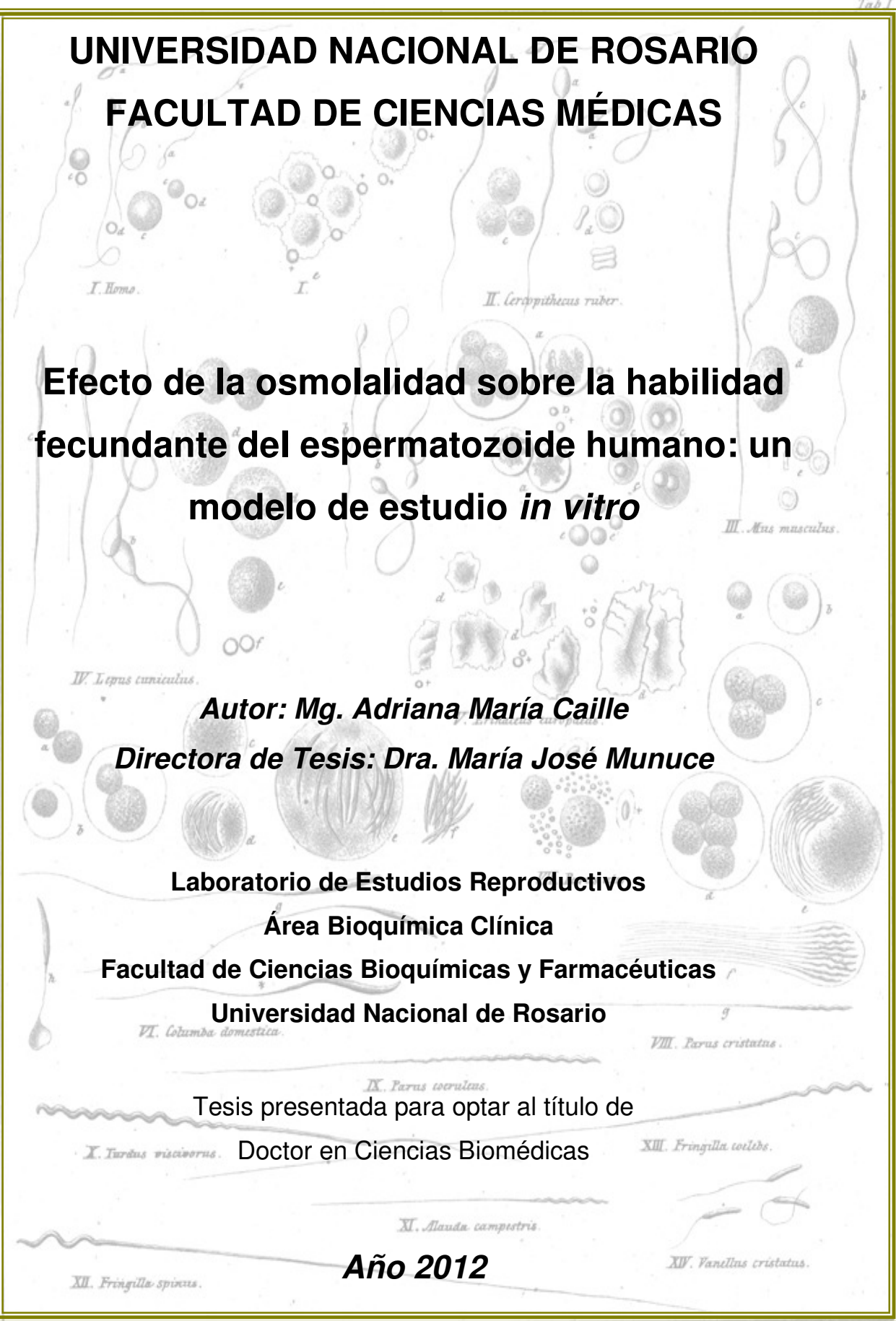
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Biomédicas

Año 2012



x. Wagner del.



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de Tesis Doctoral fué financiado parcialmente mediante:

- Beca de re-instalación a María José Munuce de UNDP/UNFPA/WHO/World Bank Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization N° 96341.

- Proyecto PIP 02153 CONICET y PICT 0115092 (ANPCYT): “Influencia de secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la fisiología espermática. Aislamiento y caracterización de proteínas de oviducto humano con capacidad de unirse a espermatozoides”.

AGRADECIMIENTOS:

Este ha sido un largo y arduo camino, durante su recorrido hubo mucha gente a mi lado que lo estimuló, acompañó y apuntaló en más de una ocasión. Por todo esto quiero darles mi entrañable y profundo agradecimiento.

- **A mis padres por darme raíces y alas para estar hoy aquí**
- **A mis hijos, Milton y Ian por ser las alas que siempre me permiten ir más allá**
- **A Tomy que me acompañó y apoyó incondicionalmente hasta donde pudo**
- **A María José, mi hermana del alma, mentora de esta locura, compañera y hacedora de este casi milagro**
- **A Cali, mi hermano en la lucha**
- **A Sergio por acompañar nuestros emprendimientos**
- **A las hermanas/amigas de la vida y del corazón, que aunque no las nombre a todas están aquí porque todas me sostuvieron y acompañaron de la mejor manera posible, con cariño (en esta lista interminable...Susy, Noris, Greis, Ieva, Edy, Patri, Mary, Barbi, Gaby, Marce, Lili, Marta, Lucre, Celina, Adriana y la lista es interminable....**
- **A José Luis Zulatto por ayudarme a crecer y seguir cuando los tiempos eran tormentosos**
- **A quienes de algún modo u otro me acompañaron en esta ardua tarea, mis compañeros de trabajo (en la Facu y en el poli), de amaneceres y anocheceres trabajando, de cursado, de risas y de llantos, de soles y tormentas, de piedras y algodones.... a todos..... muchas gracias**
- **A mis formadores, quienes impulsaron este camino y pasión que es la investigación**
- **A Rodolfo Puche, Alfredo Rigalli y Lucila por luchar y seguir luchando por este doctorado**
- **A quienes confían en mí porque muchas veces ellos son la fuerza de mi movimiento**
- **A quienes acompañaron y respetaron mi.....*bailar bajo la lluvia*....**
- **Y en este hoy, en especial a Gabriel, mi gran compañero y refugio, gracias amor**

La imagen que se presenta en la carátula pertenece al trabajo de Rudolf Wagner sobre espermatozoides de diferentes aves y mamíferos, incluyendo a los humanos. Wagner fue el primero en ilustrar y comentar sobre las diferencias morfológicas de los espermatozoides de algunas especies. Fuente: Wagner (1837, Tab. I).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido presentados como comunicaciones libres en las siguientes reuniones científicas

- Osmolalidad de los plasmas seminales. Caille A., Smith R., Bustos-Obregón E.. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Paraná, Argentina, noviembre de 1996. Poster.
- Osmolalidad de los plasmas seminales de donantes fértiles, normozoospermicos y astenozoospermicos. Caille A., Smith R., Bustos-Obregón E. Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Cusco, Perú, abril de 1997. Poster.
- La osmolalidad del medio modifica el status acrosomal del espermatozoide humano. Caille A., Zumoffen C., Ghersevich S., Munuce MJ. Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Buenos Aires, Argentina, abril de 2007. Poster.
- Equilibrio osmótico y canales de K^+ en espermatozoides humanos. Caille A., Zumoffen C., Ghersevich S., Munuce MJ. Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), San Pablo, Brasil, abril de 2009. Oral.
- Regulación del equilibrio osmótico durante la criopreservación del espermatozoide humano. Caille A., Zumoffen C., Ghersevich S., Munuce MJ. Reunión Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Panamá, Panamá, octubre de 2011. Oral.

ÍNDICE	Página
Índice de Tablas y Figuras	9
Resumen	11
Tabla de abreviaturas	12
A.- INTRODUCCIÓN	
A.1- La Osmolalidad	15
A.2- El espermatozoide humano y su estructura	17
A.3- Capacitación	20
A.4- Patrón de movimiento	23
A.5- Reacción Acrosomal	27
A.6- Tracto reproductivo masculino y transporte espermático	33
A.7- Bioquímica de las secreciones que acompañan al eyaculado	35
A.8- El tracto reproductivo femenino	37
A.9- Adquisición de capacidad fecundante: cambios que experimenta el espermatozoide en los distintos ambientes del tracto reproductivo masculino y femenino	45
A.10- Regulación del volumen espermático	50
A.11- El ión K ⁺ y su participación en los procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo femenino	51
B.- OBJETIVOS	
B.1- Objetivo general	57
B.2- Objetivos específicos	57
C.- METODOLOGÍA	
C.1- Consideraciones éticas	58
C.2.- Criterio de inclusión	58
C. 3.- Recolección y almacenamiento de fluidos	59
C.4- Determinación de osmolalidades de MC, fluido vaginal y PS, FO, FF y FP	60
C.5- Evaluación de la osmolalidad de los distintos medios utilizados	60
C.6- Variación de la osmolalidad con el tiempo post eyaculación	60
C.7- Procesamiento inicial del semen	60
C.8- Motilidad subjetiva	61
C.9- Viabilidad	61

C.10- Recuperación por Swim-up	62
C.11- Incubaciones a diferentes osmolalidades	62
C.12- Incubación bajo condiciones capacitantes	62
C.13- Evaluación de la habilidad fecundante	63
C.13.1- Fosforilación en tirosina	63
C.13.2- Reacción acrosomal espontánea e inducida	64
C.13.3- Diseño experimental 1	65
C.14- Bloqueo selectivo del canal de K ⁺	65
C.14.1- Determinación de la concentración adecuada de Quinina	66
C.14.2- Diseño Experimental 2	66
C.14.3- Acción de la Quinina	66
C.14.4- Análisis computarizado de movimiento espermático (CASA)	67
C.14.5- Diseño Experimental 3	68
C.15- Criopreservación	68
C.15.1- Protocolo de la Criopreservación	68
C.15.2- Descongelado	69
C.15.3- Acción del crioprotector y de la criopreservación	69
C.15.4- Diseño experimental 4	70
C.15.5- Exposición a medios hiperosmolales, aplicación clínica	70
C.15.6- Diseño experimental 5	71
C.16- Estudio de la aplicación Clínica	71
C.16.1- Datos procedimiento y calidad seminal según tiempo post tratamiento oncológico	71
C.17- Análisis estadístico de los datos	72

D.- RESULTADOS

D.1- Osmolalidad de los fluidos en los distintos espacios biológicos	73
D.2- Osmolalidad del PS según el tiempo post eyaculado	74
D.3- Efecto de la osmolalidad sobre la habilidad fecundante	75
D.3.1- Viabilidad	75
D.3.2- Motilidad Subjetiva	75
D.3.3- Fosforilación en residuos tirosina	78
D.3.4- Reacción Acrosomal	79
D.3.5- Población inducible	81
D.4.- Ensayos de Bloqueo de Canales de K ⁺ Sensibles a Quinina	84
D.4.1- Determinación de la concentración adecuada de Quinina	84
D.4.2- Cinética del movimiento	86
D.4.3- Morfología	88

D.4.4- Reacción Acrosomal	89
D.4.5- Población inducible	91
D.5- El uso de crioprotectores como modelo de contacto con medio hiperosmolal	93
D.5.1- Crioprotector ocriopreservación?	94
D.5.2- Viabilidad y Movimiento	97
D.5.3- Cinética del movimiento	99
D.5.4- Morfología	101
D.5.5- Reacción Acrosomal	101
D.6- Recuperación seminal de pacientes en tratamiento oncológico	105
D.6.1- Calidad seminal según tiempo post tratamiento oncológico	105
E.- DISCUSIÓN	108
F.- CONCLUSIONES	139
G.- BIBLIOGRAFÍA	140
ANEXO: Consentimientos	152
Consentimientos escritos	

ÍNDICE de TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1:** Cambios celulares del desarrollo que ocurren principalmente durante la espermatogénesis
- Figura 2:** Estructura interna del espermatozoide
- Figura 3:** Espermatozoides teñidos con Hematoxilina-Eosina
- Figura 4:** Modificación de moléculas de superficie de la membrana plasmática
- Figura 5:** Modelo hipotético de capacitación espermática
- Figura 6:** Esquemas comparativos del batido flagelar planar y semiplanar, en espermatozoides que intersectan un plano coplanar con el de batido
- Figure 7:** Cambios en el movimiento del espermatozoide durante el recorrido hacia el ovocito
- Figura 8:** Patrones de movimiento: Progresivo, en Fase de Transición e HA
- Figura 9:** Parámetros cinéticos del movimiento
- Figura 10:** Esquema con las modificaciones estructurales del sistema de membranas espermáticas de mamíferos
- Figura 11:** Rol de los lípidos durante la fusión de membranas mediante formación de intermediarios micelares no-lamelares invertidos
- Figura 12:** Expresión de CD9 ovocitaria y CD9 espermática
- Figura 13:** Modelo de los eventos tempranos de la interacción espermatozoide-ovocito de mamíferos
- Figura 14:** Representación esquemática de la localización de las proteínas testiculares y epididimarias en la cabeza del espermatozoide humano
- Figura 15:** Transporte a través del canal cervical
- Figura 16:** Estadios del transporte espermático a través del tracto reproductivo femenino humano
- Figura 17:** Gota citoplasmática
- Figura 18:** Cambios e interacciones que experimenta el espermatozoide humano en su paso por el tracto reproductivo femenino
- Figura 19:** Regulación del $(Ca^{2+})_i$ en espermatozoide de mamíferos
- Figura 20:** Modelo integrado propuesto para la activación y regulación de los canales iónicos del espermatozoide
- Figura 21:** Diferentes grupos de fármacos que bloquean canales de K^+ .
- Figura a:** Parámetros cinéticos del movimiento
- Tabla 1:** Osmolalidad de los fluidos de los tractos reproductivos femenino y masculino.

- Figura 22:** Variación de la osmolalidad del Plasma Seminal con el tiempo
- Figura 23:** Efecto de osmolalidad sobre la viabilidad de los espermatozoides humanos
- Figura 24:** Efecto de la Osmolalidad sobre la motilidad subjetiva de los espermatozoides humanos
- Figura 25:** Efecto de la exposición a medios de osmolalidades diferentes sobre el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina
- Figura 26:** Osmolalidad y reacción acrosomal
- Figura 27:** Osmolalidad y población inducible
- Figura 28:** Osmolalidad y población inducible, patrón Parche
- Figura 29:** Acción de la Quinina según la concentración sobre la viabilidad (A) y la motilidad (B)
- Figura 30:** Acción de la Quinina sobre los parámetros cinéticos del movimiento
- Figura 31:** Trayectorias de las muestras Controles y tratadas con Quinina (Q_1)
- Figura 32:** Morfología, Quinina y reversibilidad de su efecto
- Figura 33:** Acción de la Quinina sobre la Reacción Acrosomal inducida en espermatozoides capacitados 20 h
- Tabla 2:** Osmolalidades de medios utilizados habitualmente en la recolección, selección y lavado de espermatozoides humanos
- Figura 34:** Morfología y RA de espermatozoides Criopreservados
- Figura 35:** Viabilidad, Reacción Acrosomal y efecto del crioprotector y la criopreservación
- Figura 36:** Morfología y efecto del crioprotector y la criopreservación
- Figura 37:** Efecto de la criopreservación sobre la Viabilidad y la Motilidad
- Figura 38:** Parámetros cinéticos que describen las trayectorias de los espermatozoides descongelados y recuperados en distintas condiciones
- Figura 39:** Efecto de la criopreservación en la morfología de los espermatozoides
- Figura 40:** Efecto de la criopreservación en la reacción acrosomal de los espermatozoides descongelados
- Figura 41:** Calidad seminal según el tiempo transcurrido post tratamiento oncológico
- Figura 42:** Esquema del canal de K^+ en la membrana celular
- Figura 43:** Esquema del modelo propuesto para la interacción de Quinina con el canal de K^+

RESUMEN:

Las características funcionales del espermatozoide se modifican a medida que sobrelleva los procesos que lo preparan para adquirir su capacidad fecundante. La composición diferente de los fluidos de los tractos reproductivos masculino y femenino, le imprimirá una característica particular a cada espacio biológico. Como parte del proceso de adquisición de la capacidad fecundante, denominado "capacitación espermática", se remueven moléculas absorbidas o integradas a la membrana plasmática, se dan cambios en la composición lipídica y aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana. Durante el ascenso hacia el ovocito, el espermatozoide interactúa con la superficie de las células epiteliales, los distintos productos de secreción del tracto y las cubiertas del ovocito. Estas interacciones participan en la modulación de la función espermática, en la adquisición de capacidad fecundante y en la coordinación del transporte y unión de los gametos femenino y masculino. Por otra parte, los espermatozoides pueden ser capacitados y consiguen expresar su habilidad fecundante *in vitro*.

Una característica de los fluidos es su osmolalidad y está dada por la concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos presentes en el mismo. Es por esto que la osmolalidad es una variable físico-química, de gran importancia en el metabolismo intracelular, y depende tanto del tipo como de la concentración de los componentes que conforman a un fluido. Los fluidos fisiológicos, a los cuales están expuestos los espermatozoides en su tránsito hacia el sitio de la fecundación, presentan una osmolalidad variable en un rango importante (280 a 480 mOsmoles/kg). El volumen espermático estaría influenciado por el equilibrio del líquido a través de sus membranas y una falla en dicho equilibrio podría derivar en alteraciones de los mecanismos de capacitación y fecundación. Por otro lado, durante el manejo de los espermatozoides *in vitro*, ya sea durante las técnicas de reproducción asistida, como en los métodos utilizados para evaluar su capacidad fecundante, se utilizan medios y suplementos que pueden alterar la osmolalidad del medio en contacto con los espermatozoides. Es por todo esto que nuestro objetivo fué estudiar, la asociación entre la osmolalidad del medio al que se exponen los espermatozoides humanos y la adquisición de su capacidad fecundante, mediante un modelo de interacción *in vitro*.

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

ADP	di fosfato de adenosina
ALH	amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
AMPc	3', 5' fosfato cíclico de adenosina
ATP	tri fosfato de adenosina
ATPasa	tri fosfatasa de adenosina
BCF	frecuencia de batido flagelar
BSPs	Binder of SPerm family
BSA	albúmina sérica bovina
C	concentración molar de soluto
CaCaM	calmodulina
CASA	sistemas computarizados de análisis del movimiento
CatSper	canal de calcio
CO	cúmulo oóforo
DAG	diacilglicerol
FF	fluido folicular
FO	fluido oviductal
FP	fluido peritoneal
G	nº de iones formados por cada molécula de electrolito
GDP	di fosfato de adenosina
GMPc	3', 5' fosfato cíclico de guanosina
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HA	hiperactivación
Ham's F10	medio Ham
HLA	antígeno de histocompatibilidad
hMG	gonadotrofina menopáusica humana
HTF	medio Human Tubal Fluid
IAM	índice de anomalías múltiples
K⁺/Na⁺	relación catión potasio/catión sodio
KSper	canal de potasio
LIN	linealidad del trayecto
MC	moco cervical
mOsm	miliOsmoles
mM	concentración miliMolar

mV	mili volt
n	nº de moléculas osmóticamente activas
Na⁺,K⁺-ATPasa	sodio potasio tri fosfatasa de adenosina
NHX	intercambiador específico Na ⁺ /H ⁺ espermático
NS	no significativo
ON	over night
P	progesterona
PBS	buffer fosfato salino
PI	población inducible
St PM	estándar de peso molecular
PS	plasma seminal
Q	quinina
R	constante
RA	reacción acrosomal
RT	reaccionados totales
sAC	adenilato ciclasa soluble
SE	segmento ecuatorial
ES	error estándar de la media
-SH	grupo tiol
-S-S-	puentes disulfuro
-S-S-Zn-S-S-	puentes disulfuro conjugados al Zinc
STR	progresividad
Swup	método Swim-up
UI	unidades internacionales
v	volumen de agua celular
v/v	concentración volumen en volumen
VAP	velocidad de camino medio
VCL	velocidad curvilínea
VSL	velocidad rectilínea
ZP	zona pelúcida (incluye los componentes 1, 2 y 3)
Δ	disminución del punto de congelación
π	presión osmótica

Yo no busco... yo encuentro...
buscar es partir de hechos conocidos y
querer encontrar algo conocido en lo nuevo.
...Todos los caminos están abiertos y lo que
se encuentra es desconocido...
un riesgo... una sagrada aventura...

Pablo Picasso

A- INTRODUCCIÓN

El espermatozoide desde su origen en el testículo hasta el momento del encuentro e interacción con el ovocito experimenta cambios morfológicos y funcionales. El potencial fecundante del espermatozoide dependerá de la capacidad del mismo de responder funcionalmente, a las interacciones con un medio ambiente variable. El presente trabajo propone evaluar la importancia de una de las características de los fluidos, la osmolalidad, sobre la función espermática.

A.1- La Osmolalidad

La **osmolalidad** de una solución es una variable físico-química, conformada por los componentes de la misma. Estos componentes, dependiendo de que sean electrolitos, no electrolitos y del número de cargas que posean, confieren a la solución su **osmolalidad**. Así, la **osmolalidad total** de un fluido resulta de la sumatoria de los moles de partículas de los distintos componentes presentes, orgánicos e inorgánicos. Las moléculas o partículas que aportan al valor total de la **osmolalidad** de un fluido se las denominan **molécula o partícula osmóticamente activa**, u **osmolito**.

$$\text{Osmolalidad} = n^{\circ} \text{ de Osmoles/kgH}_2\text{O}$$

La presión osmótica es una propiedad coligativa de las soluciones, depende de los componentes disueltos en ellas y condiciona el movimiento del agua a través de las membranas biológicas. La célula está formada mayoritariamente por agua y por lo tanto la presión osmótica se relaciona con el equilibrio del agua y de las sales a través de las membranas celulares.

Se define a la **osmolalidad** a través de las siguientes expresiones:

$$\pi \cdot v = n \cdot R \cdot T = C \cdot R \cdot T$$

Donde:

π = presión osmótica = presión que aplicada a una solución previene el movimiento de moléculas de agua hacia el interior de la solución cuando está separada del agua pura por una membrana solo permeable al agua.

v = volumen de agua celular = cte/π

n = 1 para soluto no disociado

C = concentración molar de soluto

T = temperatura absoluta (°K)

R = constante (0,082 atm.l/mol.°K)

Una solución **1 Osmolal = 1 osmol/l** = solución cuya presión osmótica es 22,4 atm a una temperatura de 0°C.

La **osmolalidad** de una solución puede medirse a través de sus propiedades coligativas que son el descenso del punto de congelación, el descenso de la tensión de vapor o mediante el aumento del punto de ebullición. Así, la **osmolalidad** podría determinarse a través de cualquiera de estas propiedades y será:

$$\text{Osmolalidad} = \frac{\Delta}{1,86}$$

Donde, para el caso punto de congelación:

Δ = disminución del punto de congelación por cada 1,86°C de disminución de la temperatura.

Para no electrolitos o soluciones diluidas: 1 mOsm = 1 mM

Para electrolitos en solución: 1 mOsm = G x mM

Donde:

G = nº de iones formados por cada molécula de electrolito

Es debido a todo esto que la **osmolalidad** es una variable de importancia en el estudio de la **fisiología** y **metabolismo** de todas las células del organismo (Negendank, 1985; Cañas, 2002; Yeung y col., 2005). La membrana plasmática es la barrera fisiológica que separa el medio ambiente externo del interno de la célula, y representa el punto de inicio de procesos inherentes a la fisiología de la célula.

Los fluidos fisiológicos, a los cuales están expuestos los **espermatozoides** en su tránsito hacia el sitio de la fecundación, presentan una **osmolalidad** que varía desde valores isotónicos de 280 mOsm/kgH₂O en el testículo, hasta valores de alrededor de 420 mOsm/kgH₂O en el plasma seminal y fluido epididimario, mientras que en el tracto reproductivo femenino varía entre 340 mOsm/kgH₂O en el fluido vaginal y 284 mOsm/kgH₂O en el fluido uterino de fase ovulatoria (Casslén y Nilsson, 1984; Casleén, 1987; Caille, 1996).

La **osmolalidad** del **plasma seminal** está conformada por diferentes moléculas inorgánicas y orgánicas tales como prostaglandinas, serotonina y enzimas (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Geigy, 1981; Harper, 1988). Los espermatozoides escapan del plasma seminal hacia el canal cervical en pocos minutos. Si el plasma seminal ejerce alguna influencia sobre la **función espermática** y si este efecto es biológicamente relevante es aún tema de discusión ya que la permanencia de los espermatozoides en este fluido podría ser adversa (Björndhal y Kvist, 2003; Cooper y col., 2005). Por otro lado, la **osmolalidad** de los fluidos del tracto femenino varía según la fase del ciclo ovárico, siendo más elevada en el fluido uterino durante la fase lútea (Casslén, 1987; Killian y col., 1989; Leese, y col., 2001). Debido a que estos valores guardan relación con el contenido de aminoácidos y sales presentes en las distintas secreciones del tracto, la variación en la **osmolalidad** podría afectar, *in vivo*, la adquisición de la **capacidad fecundante** del espermatozoide. Así el espermatozoide deberá adaptar su maquinaria celular frente a estos desafíos para poder expresar y mantener su **capacidad fecundante**.

A.2- El espermatozoide humano y su estructura

El **espermatozoide** es una célula haploide, altamente especializada que presenta características funcionales específicas, las cuales le permiten cumplir con su objetivo de transferir el genoma masculino al gameto femenino. Las características funcionales del **espermatozoide** se modifican durante los procesos que lo preparan para adquirir su **capacidad fecundante**.

Los **espermatozoides** sobrellevan una serie de cambios en su membrana celular y estos cambios se desarrollan desde la espermatogénesis hasta la **fecundación** (du Plessis y col., 2011). Los cambios del desarrollo son el resultado de tres mecanismos diferentes: la capacidad biosintética de las células germinales, antes de la meiosis; el contacto directo con las células de Sertoli durante la espermatogénesis y con el ovocito durante la fecundación, y la **exposición a fluidos** extracelulares durante el pasaje por el tracto reproductivo masculino y femenino, principalmente durante la **maduración epididimaria** y la **capacitación** (**Figura 1**).

En el testículo los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto con las células de Sertoli, las cuales aportan sostén y nutrientes. Las células de Sertoli están relacionadas con la organización de la producción, ciclos y ondas de la espermatogénesis, debido a la comunicación existente entre ellas y las células de la

progenie espermática. Durante la espermatogénesis se dan cambios morfológicos importantes, destacándose tres fases principales: una Fase Mitótica Proliferativa, donde aumenta el número de células (espermatogonias); una Fase Meiótica donde se divide el número de cromosomas, diversidad genética (espermatocitos I a II y espermatocitos II a espermátides) y una Fase de diferenciación o espermiogénesis, donde se da el “embalaje de cromosomas para la entrega” (espermátides a espermatozoide) (**Figura 1**).

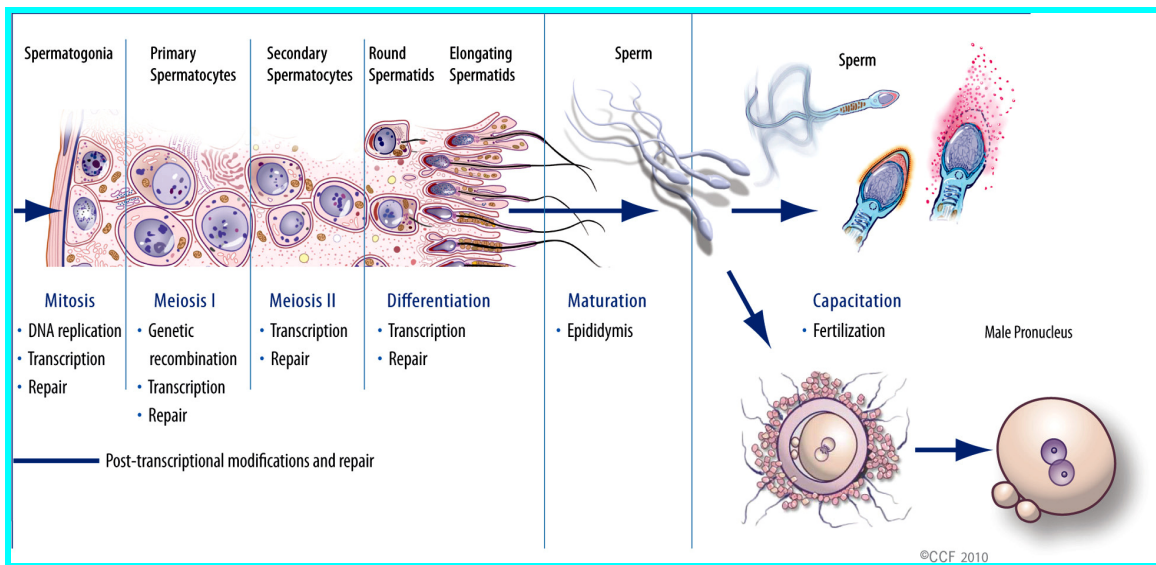


Figura 1: Cambios celulares del desarrollo que ocurren principalmente durante la espermatogénesis (tomado de du Plessis S. y col., 2011).

Esta última etapa incluye un importante **remodelado morfológico**: con el cambio de forma redonda a alargada, eliminación del citoplasma, condensación de la cromatina, generación del flagelo para la propulsión de avance, formación de la pieza intermedia con disposición en vaina espiralada de mitocondrias (energía), formación del segmento ecuatorial y región postacrosomal y desarrollo del cap acrosomal (enzimas).

Un **espermatozoide** es considerado normal cuando presenta características **morfológicas** bien definidas, una longitud total aproximada de 60 μm , con una **cabeza** de forma oval con un ancho de 2,5 a 3,5 μm y un largo de 3 a 5,5 μm . El **flagelo** (55 μm de largo total) está asociado a la producción de energía (mediante el ATP) necesaria para su movimiento. Se pueden distinguir cuatro segmentos en el **flagelo**: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal o final (**Figura 2**). Su estructura está conformada por un complejo de

microtúbulos con distribución “9+2” denominado **axonema** (**Figura 2**). Envolviendo la pieza intermedia se encuentra la vaina mitocondrial, arreglo en espiral de mitocondrias que recubren **axonema** y **fibras densas**, y con la su función de generar y almacenar la energía (Geneser, 1984; Eddy, 1988; Curry y col., 1995).

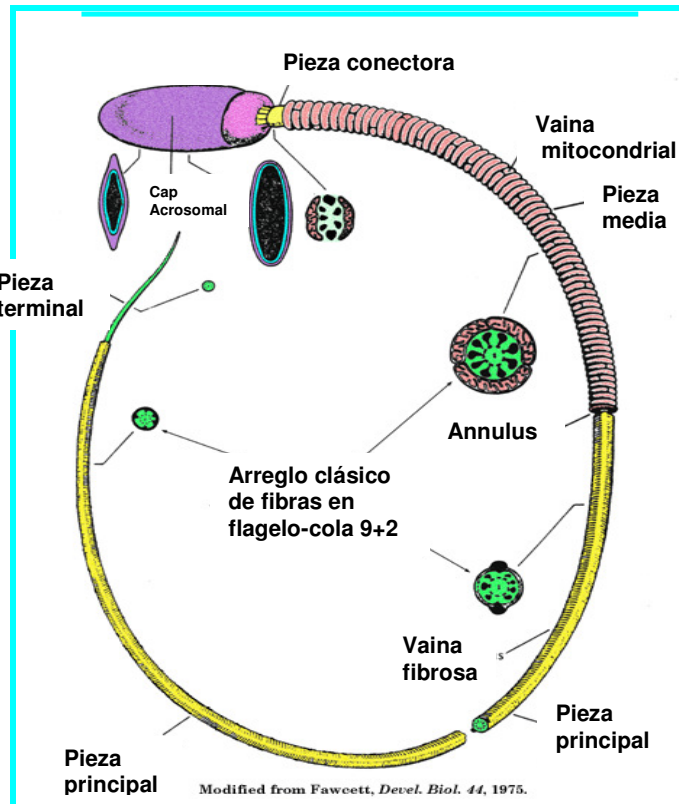


Figura 2: Estructura interna del espermatozoide (tomado de Proteomics of Spermatogenesis, 2005, Modificado por Fawcett, 1975).

La **membrana plasmática** del espermatozoide tiene la clásica estructura trilaminar con una composición variable. Mediante diferentes estudios de distribución de cargas, de unión específica a lectinas, de patrones de criofractura y marcación con anticuerpos, se ha determinado que se presentan **regiones** o **dominios** que le confieren y participan de diferentes funciones, y esto es variable según la etapa en la que se encuentre el **espermatozoide** (Eddy, 1988; Curry y col., 1995; Cooper y Yeung, 2006). Los principales dominios son: a) región anterior de la cabeza, recubre la región acrosomal y se asocia con el proceso de **capacitación** y **reacción acrosomal** (RA); b) región post-acrosomal, se asocia a eventos de **reconocimiento** y **fusión** con el oolema; c) región del flagelo, participa en el desarrollo del **movimiento** (Curry y col., 1995; Cooper y Yeung, 2006).

En la **cabeza** del espermatozoide se encuentra el núcleo y el acrosoma, y las membranas que lo recubren participan en el reconocimiento y fusión con el ovocito (**Figuras 1 y 2**). El núcleo posee una cromatina altamente condensada, resultando denso y homogéneo. La envoltura nuclear, membrana que recubre al núcleo, posee numerosos poros (Eddy, 1988).

El **acrosoma** es una especie de vesícula limitada por membranas, en forma de capuchón (**Figura 2**, Cap acrosomal) que rodea las 2/3 partes del núcleo. La matriz acrosomal se encuentra limitada por la **membrana acrosomal interna**, en estrecho contacto con la envoltura nuclear, y la **membrana acrosomal externa**, ubicada por debajo de la membrana plasmática del espermatozoide (Eddy, 1988). Esta **matriz acrosomal** es considerada como un gránulo secretor de cimógenos, con origen en el Golgi, debido a su contenido de enzimas proteolíticas, acrosina y hialuronidasa entre otras (Cooper y Yeung, 2006).

En el eyaculado normal de un hombre fértil se pueden observar espermatozoides con formas y tamaños variados como se observan en la imagen de la **Figura 3** (Eddy, 1988).



Figura 3: Espermatozoides teñidos con Hematoxilina-Eosina, observados mediante microscopio óptico 1000x.

A.3- Capacitación

El proceso de **capacitación** comienza al penetrar los espermatozoides en el tracto genital femenino, y se identifica con **cambios celulares y moleculares** que se inician en el canal cervical y continúa durante el pasaje a través de todo el **tracto femenino** (Chang, 1952; Austin, 1952; Yanagimachi, 1988). Entre las modificaciones que experimentan los espermatozoides durante la **capacitación** se describen las asociadas a la **membrana plasmática**, que incluyen remoción o modificación de

proteínas de superficie, cambios en la composición lipídica, como remoción de colesterol y aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana (**Figura 4**; Martínez y Morros, 1996).

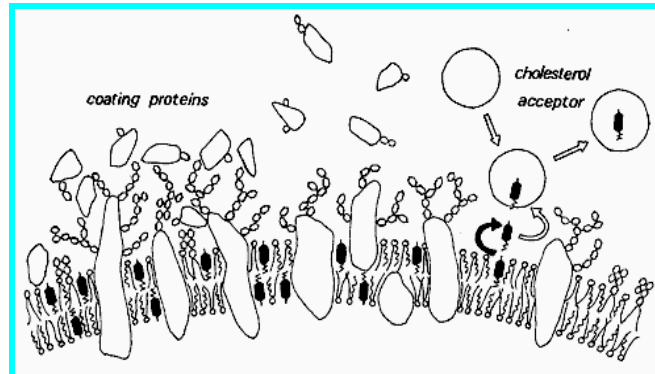


Figura 4: Modificación de moléculas de superficie de la membrana plasmática. Modelo hipotético para el mecanismo de eflujo del colesterol durante la capacitación de espermatozoides humanos. Se muestra la interfase fosfolípidos-agua por la cual migra el colesterol, y la zona del glicocalix, que consiste en glicoproteínas ancladas a la membrana plasmática (tomado de Martínez y Morros, 1996).

La reversibilidad del proceso de **capacitación** se evidencia cuando, al agregar sustancias presentes en el **plasma seminal** a espermatozoides **capacitados**, se reduce la habilidad para fecundar, o sea, se **decapacitan** (Bedford y Chang, 1962). La **capacitación** no es un proceso especie-específico ya que, espermatozoides y ovocitos de una determinada especie pueden fecundarse en el oviducto de otra (Sailing y Bedford, 1981).

Los espermatozoides eyaculados **no-capacitados** adsorben numerosas proteínas en su superficie, debido a que esta se encuentra cargada negativamente. Estas proteínas se disocian progresivamente por unirse a glicosaminoglicanos en el tracto genital femenino o, *in vitro*, al incubarse con heparina (Martínez y Morros, 1996). Algunos aceptores de **colesterol**, como la albúmina, pueden captar el colesterol presente en la membrana plasmática del espermatozoide, resultando en una bicapa lipídica más **fusogénica** (Sullivan y col., 2007; Griffiths y col., 2009; Bailey, 2010).

Durante la **capacitación** de los espermatozoides humanos, se ha demostrado que se fosforilan al menos 7 proteínas (200, 112, 104, 48, 42, 31 y 25 kDa) y otras 14 (122, 105, 95, 89, 73, 62, 51, 46, 40, 33, 30, 28, 25, y 22 kDa) se autofosforilan. Entre todas ellas, las de 95 y 51 kDa se fosforilan en residuos de tirosina, participando en el

proceso de **capacitación/RA** y unión a la zona pelúcida (ZP) (Naz, 1996). Potencialmente, algunas citoquinas y factores de crecimiento, presentes en el plasma seminal y secreciones del tracto femenino, disparan las **fosforilaciones** en tirosina (Naz, 1996). Aunque los mecanismos involucrados aún se ignoran, se ha postulado que las fosforilaciones jugarían un rol en la **regulación** y **función** de diferentes canales de K^+ y Ca^{2+} (**Figura 5**; Rotem y col., 1990; Bailey, 2010). Las vías de transducción de señales que han sido identificadas en el proceso de **fosforilación** incluyen: el sistema adenilato ciclasa, AMPc y proteína quinasa A; la vía de la fosfolipasa C, diacilglicerol y proteína quinasa C y la vía guanilato ciclasa, GMPc y proteína quinasa C (Gilbert, 2000; Abou-haila y Tulsiani, 2009).

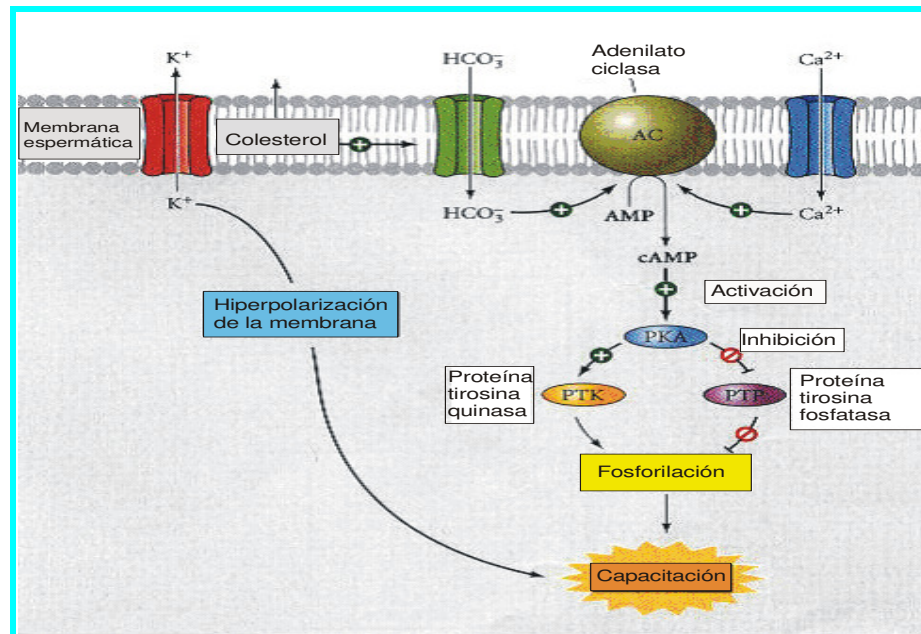


Figura 5: Modelo hipotético de capacitación espermática (tomado de Gilbert, 2000).

Una vez que los espermatozoides se **capacitan** expresan el patrón de **movimiento hiperactivado** (HA) y sobrellevan la **RA**. El patrón de movimiento **HA** se expresa en el oviducto, y aún están **HA** cuando comienza la **RA** (Bedford, 1983; Fraser, 1984; Wassarman, 1987; Fraser y Ahuja, 1988).

Además, los espermatozoides de diferentes especies pueden ser **capacitados** al ser incubados en medios artificiales, expresando el patrón **HA** y la **RA** (Sidhu y Guraya, 1989; Chan y Tucker, 1991; Zaneveld y col., 1991; Bastias y col., 1993). Para conseguir la **capacitación in vitro**, es necesario que los medios sintéticos utilizados

contengan una fuente de energía como piruvato, lactato y glucosa, una fuente proteica como la albúmina, y además HCO_3^- y Ca^{++} (Yanagimachi, 1988). Los espermatozoides humanos también consiguen expresar su habilidad fecundante al ser incubados en medios artificiales (Aitken 1990; Zaneveld y col., 1991; Yeung y col., 1994; Miranda y col., 1997; Tay y col., 1997). La albúmina remueve el colesterol de las membranas y sería una señal inicial en la cascada de eventos que culminan en la **capacitación** (Figura 5; Yanagimachi, 1988; Cross, 1996). El alto contenido de colesterol en el **plasma seminal** sería uno de los encargados de prevenir la **capacitación prematura** de los espermatozoides (Cross, 1996, 1998). Durante la **capacitación** los espermatozoides adquieren la capacidad de responder a los inductores de la **RA**, prerequisite esencial para que ocurra la fusión de gametos (Abou-haila y Tulsiani, 2009).

A.4- Patrón de movimiento

El **patrón de movimiento** es otra característica que se modifica en los espermatozoides en el tracto genital femenino. Es importante para la función de transporte de los espermatozoides adquirir el **movimiento progresivo**.

El **movimiento progresivo**, comúnmente observado en espermatozoides eyaculados, se describe como un batido con ondulaciones que se propagan a lo largo del flagelo (Figura 6; Guerrero y col., 2011). Este patrón presenta una **alta frecuencia** del batido flagelar, con **baja amplitud**, y como consecuencia, el espermatozoide se impulsa progresivamente hacia adelante (**movimiento progresivo, Figura 6**).

Al progresar el espermatozoide a través del tracto genital femenino, el **movimiento** cambia de patrón (Figura 7). En el paso a través del moco cervical los espermatozoides se ubican unidireccionalmente, como resultado del alineamiento de largas cadenas de glicoproteínas de alto peso molecular existentes en el moco cervical de mitad de ciclo (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Barrat y Cooke, 1991).

La energía necesaria para que se genere el movimiento y se propague la onda a todo lo largo del flagelo del espermatozoide, es donada por el **ATP** y la energía se genera por un proceso mecánico-químico que se acopla a una desfosforilación enzimática de **ATP** (Grootegoed y Den Boer, 1989). El axonema posee actividad adenilato quinasa que resintetizaría algo del **ATP** desfosforilado, un número de enzimas glicolíticas que permanecen unidas a la pieza media, a través de la glicólisis,

podrían generar el **ATP** necesario para este proceso (Grootegoed y Den Boer, 1989). La F-actina y la miosina utilizarían la energía almacenada como **ATP** para generar fuerzas, mientras que, la tubulina en los microtúbulos del axonema interactúa con la actividad **ATPasa** de los brazos de dineína.

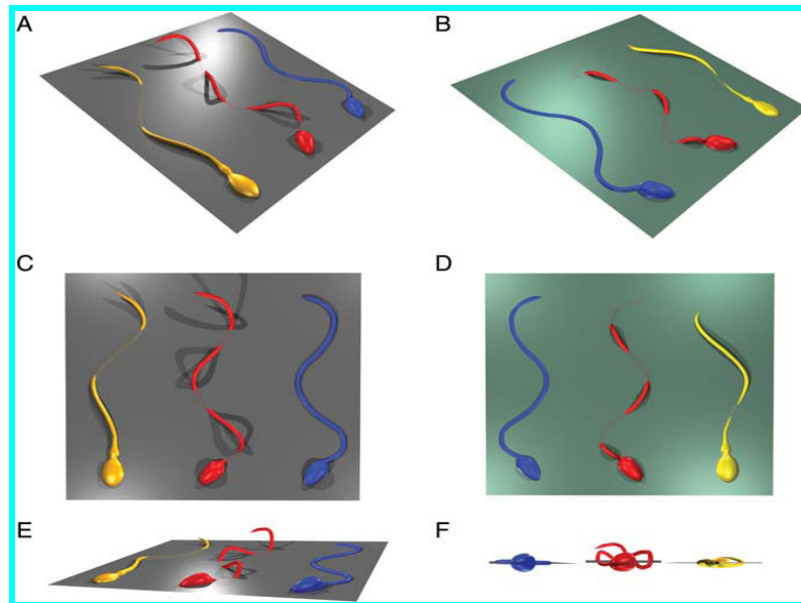


Figura 6: Esquemas comparativos del batido flagelar planar y semiplanar, en espermatozoides que intersectan un plano coplanar con el de batido. Las desviaciones fuera del plano disparan batido cuasi-planar en espermatozoide de erizo de mar (rojo) o de humano (amarillo). Este batido genera una onda diferente en cada uno, proveyendo un movimiento adecuado para cada especie y entorno de movimiento (ver a cada lado del plano A con B y C con D). Se generan espirales a un lado y otro que se evidencia al observar el movimiento de cabeza a cola (E y F), para humano es tipo helicoidal generando un movimiento mas progresivo. Para comparar se compensa con escala por ser el espermatozoide de erizo de mar 2 veces mas corto (tomado de Guerrero y col., 2011).

El sistema de mitocondrias de la pieza media es capaz de producir **ATP** por medio de la **fosforilación oxidativa** (Grootegoed y Den Boer, 1989). Entonces, en la generación del **movimiento espermático** y sus modificaciones son importantes: la generación de **AMPc**, una **fosforilación de proteínas** endógenas específicas, una **transfosforilación** entre ATP libre y tubulina unida a GDP y el rendimiento energético por **desfosforilación** de ATP y ADP (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Durante la **capacitación**, en la mayoría de las especies de mamíferos, los espermatozoides desarrollan un movimiento muy vigoroso, denominado **hiperactivación** de la **motilidad** (Yanagimachi, 1969).

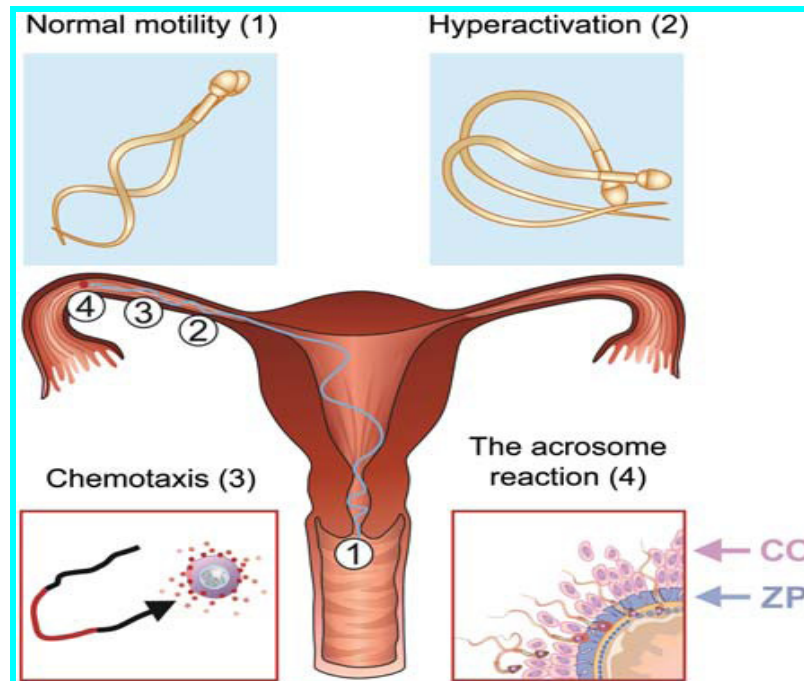


Figure 7: Cambios en el movimiento del espermatozoide durante el recorrido hacia el ovocito. Patrón normal (1) desde eyaculado con baja amplitud de ondas de batido simétrico. HA (2) en oviducto, ondas de gran amplitud de batido asimétrico y desarrollo de fuerzas mucho mayores para penetrar el medio de alta viscosidad del tracto reproductivo femenino. Quimiotáxis (3) cerca del sitio de fecundación en el ampulla, quimioattractantes, puntos rojos, liberados por células del cúmulo oósforo (CO) o por el ovocito, ayudan al espermatozoide a encontrarlo en el epitelio oviductal. La RA (4) ocurre dentro del cúmulo o en la zona de contacto con la ZP, las enzimas hidrolíticas del acrosoma y el movimiento ayudan a que penetre las envolturas del ovocito (tomado de Kirichok y Lishko, 2011).

La **HA** se caracteriza por un vigoroso batido flagelar que lleva a que la cabeza del espermatozoide describa figuras estrelladas o de ochos erráticos (**Figura 8**), lo cual ayudaría a los espermatozoides a desprenderse del epitelio oviductal para avanzar hacia el ovocito (Katz y Yangimachi, 1980; Shalgi y Philips, 1988).

El cambio en el patrón del movimiento flagelar de bidimensional a tridimensional en el humano, debido a los cambios metabólicos al avanzar el estado de **capacitación**, genera **ondulaciones flagelares** con gran curvatura en la parte proximal del flagelo y aumento en la **amplitud** del **batido**, acompañada de una disminución en la frecuencia del batido flagelar (Aitken, 1990; Zaneveld y col., 1990, Burkman, 1991; Suárez y col., 1991). Entre los componentes del ambiente biológico externo a los espermatozoides, el ión **Ca⁺⁺** actuaría sobre la iniciación y mantención del movimiento **HA**, siendo controlado o modificado por la acción de moléculas tales como: **HCO₃⁻**, **K⁺**, sustratos que proveen energía y nutrientes como la taurina e

hipotaurina presentes en cantidades importantes en el FF y por albúmina (Go y Wolf, 1985; Cañas, 2002). Durante la **capacitación**, la expresión del movimiento **HA** es precedido por un aumento progresivo en el nivel de **AMPc** intracelular (Yanagimachi, 1988; White y Aitken, 1989; Mortimer y Mortimer, 1990). Estos procesos ocurren en la cola del espermatozoide y se ha determinado que cambian durante la **capacitación** y/o la **RA** (Rotem y col., 1990, Bailey, 2010). Los procesos podrían ser modulados o incrementados por la intervención de **influjos** o **eflujos** de los **iones Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ y H⁺**. Un aumento en la concentración del **K⁺** inhibe el movimiento **HA** (Fraser, 1984), lo que podría deberse a una modificación del **equilibrio** entre los iones **Na⁺** y **K⁺**, a una activación de la **Na⁺,K⁺-ATPasa**, a una disminución del **ATP** disponible para las proteínas contráctiles o a una disminución en la concentración de **Na⁺** intracelular con la consiguiente disminución en el intercambio por **Ca⁺⁺** extracelular (Sidhu y Guraya, 1989).

El desarrollo de sistemas computarizados de análisis del movimiento (CASA, **Figura 8**) ha hecho posible identificar y cuantificar la incidencia de la **HA**. Los espermatozoides no manifestarían este patrón de movimiento en forma sincrónica (Mortimer y Swan, 1995) y el máximo de actividad se observa a partir de 1 h de incubación (Wang y col., 1993).

Se utilizan parámetros cinéticos del movimiento para describir las trayectorias y patrones de movimiento, siendo los más utilizados la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad rectilínea (VSL), la velocidad de camino medio (VAP) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Además se pueden utilizar la frecuencia de batido flagelar (BCF), y algunos parámetros derivados como son la rectitud (STR), y la linealidad (LIN) (**Figura 9**).

Al definir al patrón de movimiento **HA** mediante los parámetros cinéticos que surgen del análisis objetivo del movimiento (**Figuras 8 y 9**) y en condiciones estrictas de incubación (2-4 h a 37°C, y cámara de evaluación de 200 µm), se observa que los espermatozoides deben presentar una **VCL > 100 µm/s**, una **LIN < 65%** y un **ALH > 7.5 µm**. Cuando en estas condiciones una muestra presenta 14% **HA** se correlacionará con > 75% de fecundación *in vitro* (Burkman y col., 1991).

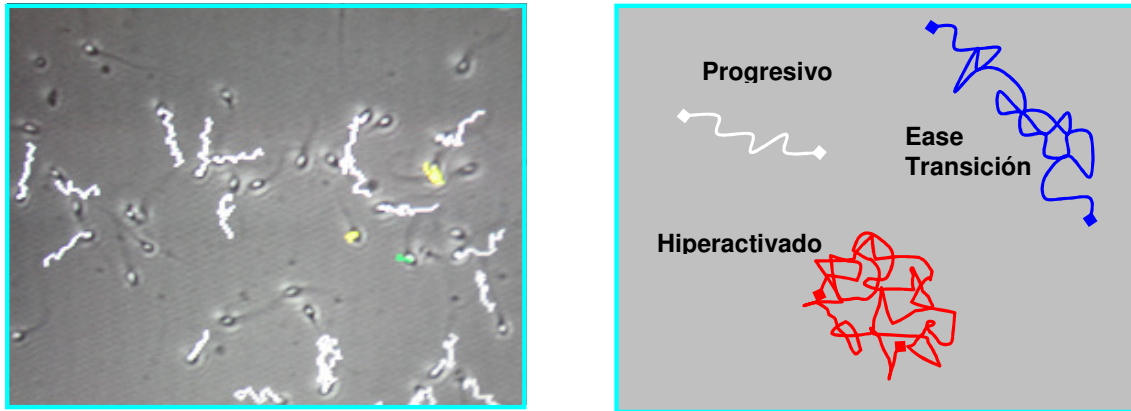


Figura 8: Patrones de movimiento: Progresivo, en Fase de Transición e HA. Se aprecia la imagen conseguida mediante CASA y la esquematización de las trayectorias que definen cada patrón.

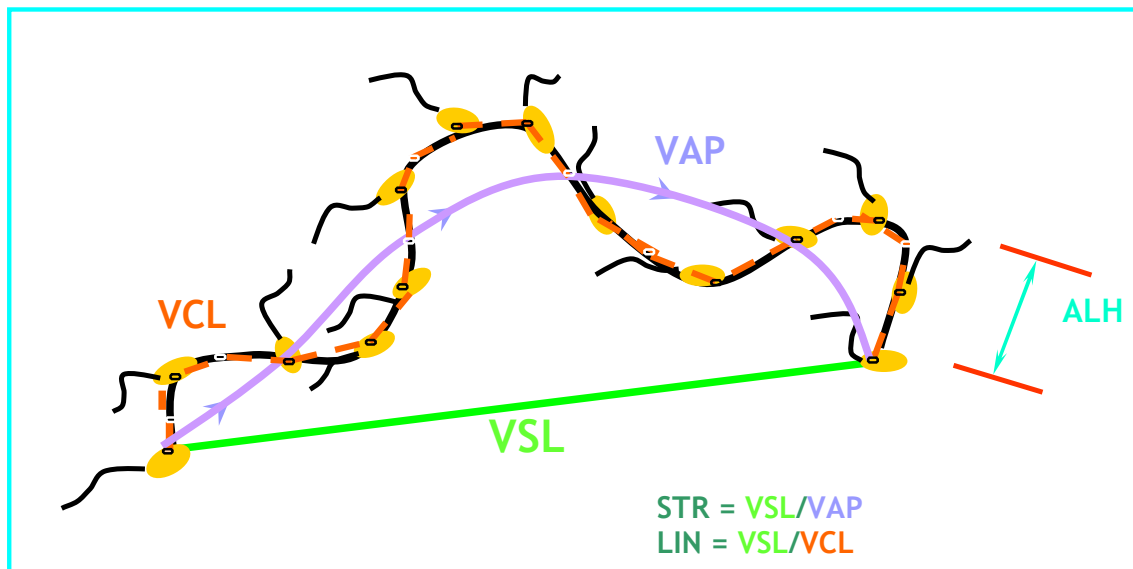


Figura 9: Parámetros cinéticos del movimiento

A.5- Reacción Acrosomal

El espermatozoide presenta receptores para hormonas (progesterona) y para oligosacáridos (ligando de manosa) los cuales se hacen más accesibles luego de la **capacitación**, aumentando la susceptibilidad a diversas moléculas presentes en el **fluido** del tracto, que actuarían como **inductores** de distintos procesos que se detallaran a continuación.

Los espermatozoides **no capacitados** no son estimulados por los **inductores**, y solo al completarse la **capacitación**, están preparados para sobrellevar la **RA** (Yanagimachi, 1981; Llanos, 1989; Sidhu y Guraya, 1989). Bajo condiciones

fisiológicas la **RA** es inducida por progesterona presente en el **FF** (Suárez y col., 1986; Martínez y Morros, 1996), glicosaminoglicanos (Meizel, 1985) y glicoproteínas de la ZP (Cross y col., 1988; Martínez y Morros, 1996; Naz, 1996).

La **RA** es un complejo proceso excitotóxico que ha sido objeto de numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* y se caracteriza por la **fusión** y posterior **fenestración** de las membranas acrosomal externa y plasmática del espermatozoide con la consecuente liberación del contenido acrosomal (**Figuras 10 y 11**; Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1994; Toshimori, 2011).

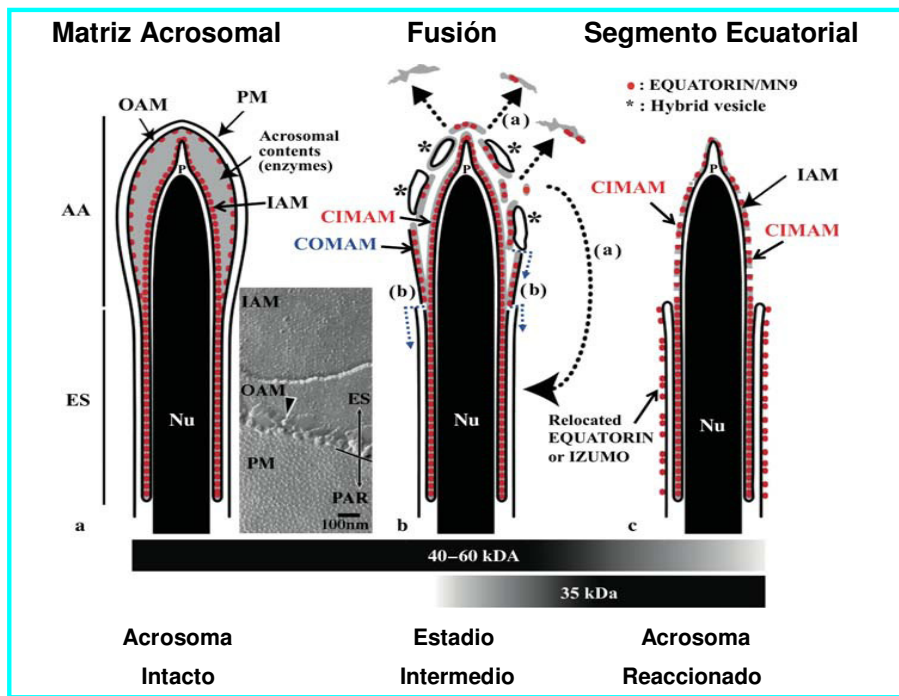


Figura 10: Esquema con las modificaciones estructurales del sistema de membranas espermáticas de mamíferos. Cambio y relocalización de proteínas en membranas acrosomales. (a) Antes de RA (intacto). Microfotografía de freeze-fractura luego de tratamiento con filipina (colesterol marcado, punta de flecha). PAR: Partículas Intra-membrana de membrana acrosomal interna (IAM) con arreglos más abundantes y regulares que en membrana acrosomal externa (OAM). PAR densas en membrana plasmática (PM) libre de colesterol de región postacrosomal. (b) Durante RA. (a y b) posibles rutas para dos proteínas (EQUATORIN e IZUMO1) durante relocalización en superficie. (c) Luego de RA la IAM queda expuesta en región acrosomal anterior. AA: acrosoma anterior; CIMAM: complejo IAM-matriz acrosomal; COMAM: complejo OAM-matriz acrosomal; ES: segmento ecuatorial; Nu: núcleo; P: perforatorium (tomada de Toshimori, 2011).

El vertido de las enzimas, al producirse la **RA**, como respuesta a los **inductores**, favorece la penetración de las cubiertas ovocitarias, habiendo además

un reacomodamiento de moléculas en la **matríz acrosomal** que actuaran luego a modo de complejo receptor en la unión con la ZP del ovocito (Brewis y col., 2005; Cooper y Yeung, 2006; Reid y col., 2011).

El **acrosoma** presenta dos regiones, una anterior, la cual se remueve durante la **RA**, y una posterior o segmento ecuatorial que se mantiene luego de reaccionado el espermatozoide prácticamente intacta, y que participará durante la **fusión** con la membrana plasmática del ovocito (oolema) (Toshimori, 2011; **Figura 12**). Es importante destacar que las membranas una vez que se produce la **RA** presentan una estructura diferente a la anterior, ya que ahora hay una continuidad entre membrana plasmática por debajo del segmento ecuatorial, se continúa en esta zona con membrana acrosomal externa y acrosomal interna, siguiendo por encima del segmento ecuatorial en membrana acrosomal interna como se observa en la **Figura 10** (de Jonge, 2005; Suarez y Pacey, 2006).

Se han postulado diversos mecanismos que podrían conducir a la **RA**, entre ellos, puede ser iniciada luego de la **activación** de **receptores** de membrana que conduciría finalmente a la **fosforilación** de **proteínas** y/o a un **aumento** del **Ca⁺⁺** intracelular (de Jonge, 2005; Suarez y Pacey, 2006, Abou-Haila y Tulsiani, 2009; Toshimori, 2011).

La superficie del espermatozoide se encuentra cubierta por **macromoléculas** que protegen o estabilizan la membrana plasmática previniendo que los espermatozoides experimenten una **RA prematura**, mientras son transportados a través del **tracto genital femenino** (Cooper y Yeung, 2006). Durante el proceso de **capacitación** muchas de estas moléculas son **removidas** de la superficie facilitando la **fusión** entre membrana plasmática y acrosomal externa (**Figuras 10 y 11**).

Recientemente ha surgido una controversia respecto del sitio donde el espermatozoide sobrelleva la **RA**. En estudios realizados con espermatozoides de ratón y usando ovocitos sin células del cúmulo se determinó que la **RA** ocurre en la superficie de la ZP (Storey y col., 1984). Sin embargo, al utilizar el complejo cúmulo-ovocito intacto se determinó que los espermatozoides al contactar la ZP con su acrosoma intacto, raramente pasaban a través de ella, mientras que los espermatozoides que habían comenzado a reaccionar antes de contactarla conseguían pasar a través de ella, lo cual indicaría que el sitio fisiológico relevante para la **RA** comienza antes que el espermatozoide contacte la ZP (Jim y col., 2011). La **RA** podría ocurrir también en la superficie de la ZP, pero quizás sea una excepción

más que una regla. Si esto es fisiológicamente relevante se sugiere que la unión a la ZP (o el tamaño limitado de los intersticios de la matriz) suaviza o detiene el movimiento progresivo de los espermatozoides motiles y el batido vigoroso del flagelo lo que se traduce en una señal mecánico sensora lo que lleva a la movilización de los reservorios acrosomales de Ca^{2+} y la inducción de la **RA**.

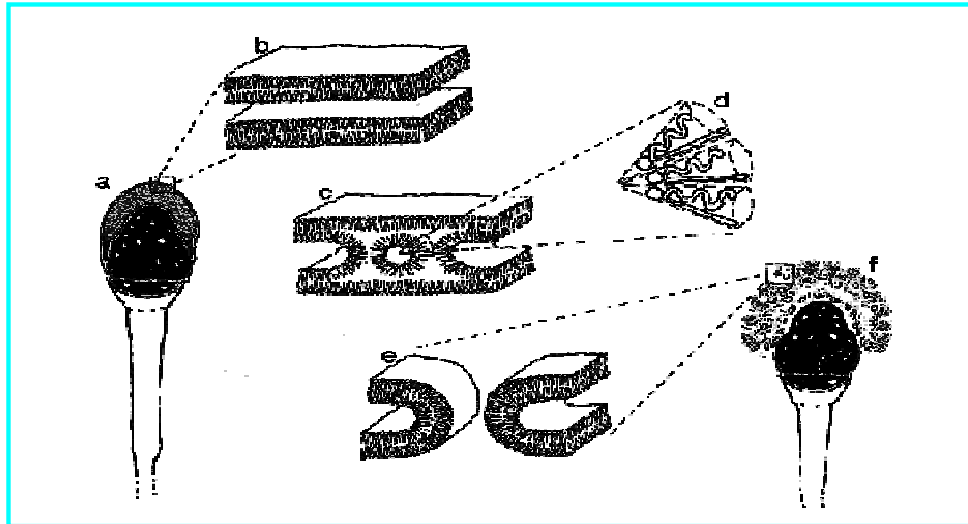


Figura 11: Rol de los lípidos durante la fusión de membranas mediante formación de intermediarios micelares no-lamelares invertidos. a- espermatozoide no capacitado, b- detalle de membrana plasmática y acrosomal externa superpuestas, c- intermediario micelar invertido, d- lípidos en disposición cónica (ej.: plasmalógeno poliinsaturado fosfatidiletanolamina) formando varas de micelas invertidas, e- formación de vesículas lamelares, f- espermatozoide reaccionado (tomado por Martínez y Morros, 1996).

La **RA**, además de ser esencial para el paso de los espermatozoides a través de las cubiertas ovocitarias: células del cúmulo y ZP, es también un requisito para la **fusión** del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (**Figura 12**, Toshimori, 2011). Durante el re-arreglo de las membranas se genera el **segmento ecuatorial**, fundamental en la **fusión** entre los gametos masculino y femenino.

Para que los espermatozoides exhiban su habilidad de unirse a la ZP, deben completar **tres fases diferentes** de **maduración**, la **espermátogénesis** en el testículo, la **maduración epididimaria** y la **capacitación** en el tracto reproductivo femenino. Estos eventos llevan a una **remodelación** en la superficie espermática que será crítica para el reconocimiento y la adhesión a las cubiertas ovocitarias externas. La unión a la ZP es especie específica y no esta mediada por una unión a receptor simple. Se han evaluado diferentes modelos que involucran a una multiplicidad de interacciones receptor-ligando. Esto surge por la observación de la necesidad de una

agregación dinámica de proteínas que parece importante para el reconocimiento espermatozoide-ZP y la unión. El remodelado de la superficie facilitaría el ensamble del **complejo de zona de reconocimiento multimérico** (MZRC) (Reid y col., 2011). Baibakov describe que los espermatozoides se unen reversiblemente a la ZP y permanecen intactos por varias horas, lo cual resulta inconsistente con la idea de un ligando de la ZP que interactúe con un receptor espermático para inducir la **RA** a través de una vía clásica ligando-receptor de transducción de señales (Baibakov y col., 2007). Se ha descrito a ligandos O-glicanos de la ZP como inductores de la **RA** (Baibakov y col., 2007). Sin embargo ZP1 no participa en fertilidad y la glicosilación ligada a O de ZP2 y ZP3 es escasa (Baibakov y col., 2007). El rol de los O-glicanos en la exocitosis ha perdido vigencia debido a su inhabilidad de definir el ligando de la ZP y el receptor de la superficie espermática (Liu y col., 1997). Actualmente con un simple ensayo de pasaje a través de filtro de poro semejante al tamaño de la matriz de la ZP se ha determinado una “inducción” de la exocitosis del acrosoma en todos los espermatozoides (Baibakov y col., 2007).

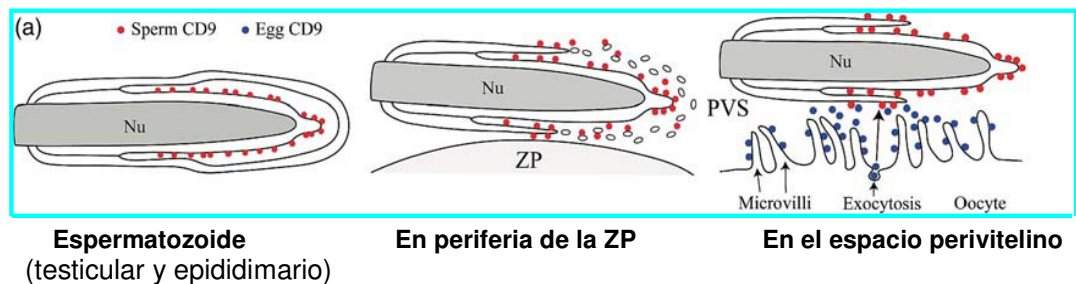


Figura 12: Expresión de CD9 ovocitaria y CD9 espermática. (a) Se muestra la localización y comportamiento de CD9 espermática (puntos rojos) y CD9 del ovocito (puntos azules). Nu: núcleo; ZP: zona pelúcida; PVS: espacio perivitelino (tomado de Toshimori, 2011).

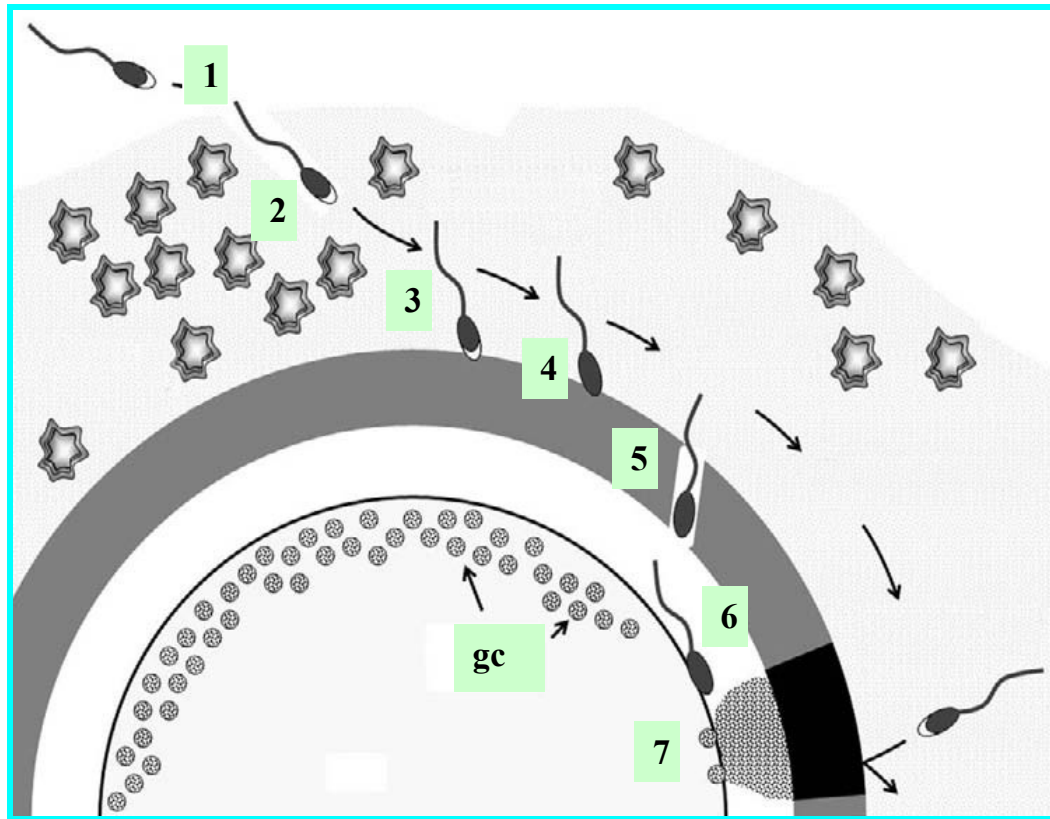


Figura 13: Modelo de los eventos tempranos de la interacción espermatozoide-ovocito de mamíferos. (1) Capacitación (incluye quimiotaxis); (2) Penetración del cúmulo oósforo; (3) Unión a ZP; (4) RA; (5) Penetración de la ZP, células del Cúmulo y matriz extracelular; (6) Unión de gametos y fusión; (7) Liberación de gránulos corticales (gc) y Reacción de zona (modificado de The Physiology of Reprod Chapter 2 Fertilization in mammals. H. Florman y T. Ducibella, 2006).

A modo de resumen, según el **modelo propuesto (Figura 13)**, el proceso de interacción procede en los siguientes estadios: 1: Capacitación espermática que se completa en el oviducto. Parte de este proceso involucraría el desarrollo de una respuesta quimiotáctica. 2: Penetración de la matriz extracelular del complejo cúmulo oósforo. En esa etapa se piensa que el espermatozoide retiene el **acrosoma intacto** (en blanco en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide). El ambiente que embebe al cúmulo puede contener componentes solubles e insolubles que estimulan al espermatozoide. 3: Espermatozoides acrosoma-intacto alcanzan la ZP y se unen a ZP3. 4: ZP3 dispara la RA. 5: El espermatozoide penetra la ZP. 6: El espermatozoide se une y fusiona con la membrana plasmática del ovocito. 7: La exocitosis de los gránulos corticales es un evento temprano de la activación del ovocito. La liberación del contenido de los gránulos corticales modifica la ZP (la “reacción de zona”) y forma parte del bloqueo de la fecundación polispérmica.

A.6- Tracto reproductivo masculino y transporte espermático

El espermatozoide debe estar preparado para atravesar y permanecer en ambientes de composición y características variables, desde la **espermiación** testicular, permaneciendo suspendido desde minutos hasta semanas según la región en la que se encuentre (Zhu, 1994a; Suarez, 1999; Björdhal y Kvist, 2003; Cooper y Yeung, 2003). En los últimos años, ha cobrado interés el estudio de la **composición** de los **fluidos** del **tracto reproductivo** masculino y femenino (de Jonge, 2005; Cooper y Yeung, 2006; Liu y col., 2006; Cooper y col., 2008).

El **ambiente testicular** es **isotónico** respecto del suero y con una composición diferente a las del plasma sanguíneo y linfa testicular (Calamera, 1977; Waites, 1977). Los espermatozoides, en su paso hacia el epidídimo, se relacionan con el fluido resultante de la mezcla del fluido testicular y de la rete testis, mezcla que posee una composición distinta a la del plasma sanguíneo respecto de proteínas, hormonas, aminoácidos, azúcares e iones (pobre en proteínas, HCO_3^- y Na^+ y rica en aminoácidos, K^+ y Cl^-) (Waites, 1977; Mann y Lutwak-Mann, 1981). Los fluidos testiculares y de los conductos mencionados no contienen glucosa ni fructosa y sí altas concentraciones de inositol, y se sugiere que ayuda a mantener la **presión osmótica** de la célula (Calamera, 1977; Waites, 1977; Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Los espermatozoides presentes en el **testículo**, inmóviles aún con un contenido de ATP similar al del espermatozoide **eyaculado**, poseen una **baja capacidad fecundante** antes de llegar al epidídimo. Los espermatozoides en esta región del tracto presentan como característica **membranas** que poseen mayor contenido de ácido palmítico y colesterol que las del espermatozoide eyaculado. En relación a los iones, el contenido de **K^+** y **Mg^{++}** del espermatozoide testicular es el mismo que el del espermatozoide epididimario mientras que la cantidad de **Na^+** y **Cl^-** es tres veces mayor (Waites, 1977; Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Los fluidos de los distintos ambientes facilitan el transporte pasivo de los espermatozoides a través del tracto reproductivo masculino. A nivel del epidídimo el transporte es ayudado por el flujo de las secreciones desde el testículo, la actividad de las ciliadas del epitelio luminal y la actividad contráctil del músculo liso de los conductos eferentes (Harper, 1988; Yanagimachi, 1988). El tránsito epididimario es bastante lento (12 días en el humano) y disminuye alrededor de un 10% al aumentar la frecuencia de las eyaculaciones. Las modificaciones físico-químicas y morfológicas en el espermatozoide, definidas como "**maduración epididimaria**", incluyen a nivel

del núcleo una modificación del ADN debido a un aumento en los puentes disulfuro entre las proteínas nucleares; cambios en la **membrana plasmática** como la modificación de algunos fosfolípidos y cambios en la composición de moléculas de su superficie y la adquisición de movilidad (Cooper y Yeung, 2006). Algunas de estas modificaciones son atribuidas a interacciones con el **fluido** en el cual se encuentra suspendido (Chan y Tucker, 1991; Cooper y Yeung, 2006). Se ha señalado a la baja concentración de fructosa como responsable de la quiescencia de los espermatozoides epididimarios, pero también se lo atribuye a la alta relación K^+/Na^+ (Calamera, 1977). La **osmolalidad** y la **composición química** del fluido epididimario varían de un segmento a otro del mismo, lo cual podría generar los cambios observados en la **membrana plasmática** del espermatozoide al exponerse a estos fluidos, en las distintas regiones del mismo (Cooper y Yeung, 2006). Una consecuencia podría ser el **aumento** observado en la carga negativa neta de la superficie de la membrana, así como el aumento en la capacidad de adherirse a la ZP del ovocito a medida que atraviesa el epidídimo (Yanagimachi, 1988). Durante la **maduración epididimaria**, se incorporan al espermatozoide grandes cantidades de **colesterol** presumiblemente para estabilizar la **membrana plasmática** durante el tránsito del espermatozoide por el **tracto femenino** (Cooper y Yeung, 2006).

Una vez en los conductos deferentes, los espermatozoides podrían experimentar nuevas modificaciones relacionadas con la "**maduración**" y adquisición de **capacidad fecundante**, especialmente en aquellas especies donde el tránsito por este conducto es prolongado, como es el caso del humano (Harper, 1988; Chan y Tucker, 1991).

Aquí es importante destacar también la modificación de proteínas en las diferentes regiones de la cabeza del espermatozoide. En la **Figura 14** se destaca el origen de las **proteínas** adquiridas por el espermatozoide, en los diferentes espacios del tracto reproductivo masculino, presentes en la cabeza del espermatozoide y su relación con la función durante los procesos de **capacitación**, **interacción** con el **ovocito** y **fecundación** (Cooper T., Yeung C., 2006).

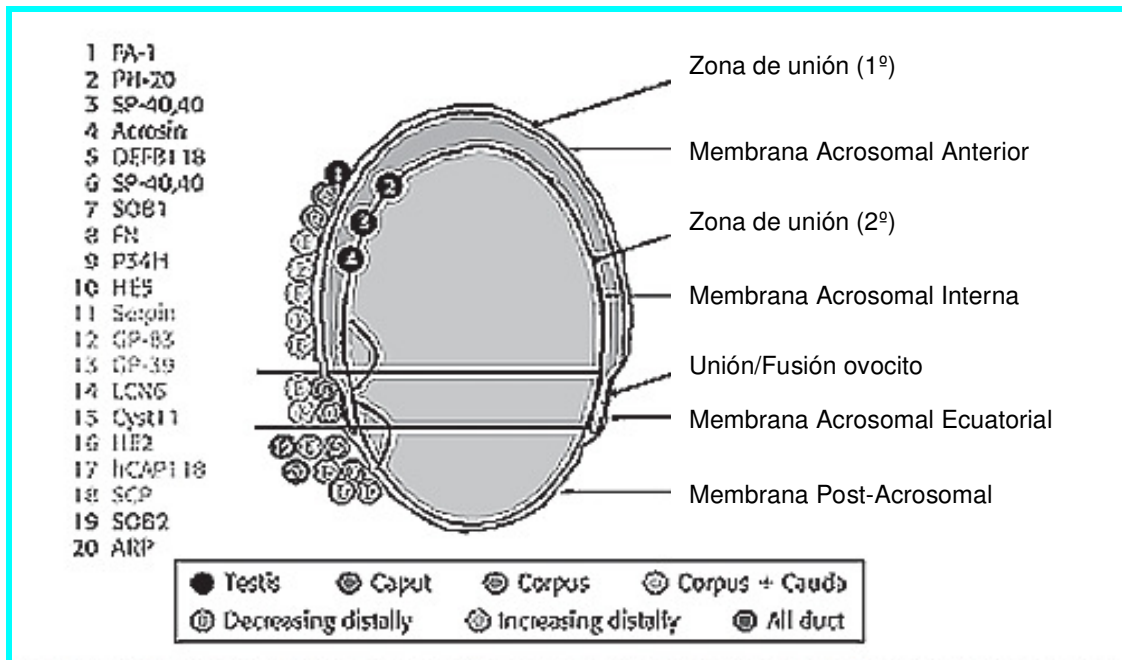


Figura 14: Representación esquemática de la localización de las proteínas testiculares y epididimarias en la cabeza del espermatozoide humano (tomado de Cooper T., Yeung C., 2006).

A.7- Bioquímica de las secreciones que acompañan al eyaculado

Durante el proceso de eyaculación y emisión seminal los **espermatozoides maduros**, suspendidos en las secreciones testiculares y epididimarias, se contactan durante su paso por el conducto deferente y la uretra con las secreciones de las glándulas anexas principalmente de vesículas seminales, próstata y glándulas de Cowper. El aporte de estas secreciones le imprime a este fluido características bioquímicas particulares, la mayor parte de la porción fluida del eyaculado proviene de las vesículas seminales (60%) y de la próstata (30%). Estas secreciones aportan moléculas, entre las que se pueden citar para la secreción prostática ácido cítrico, fosfatasa ácida, Zn^{++} y Mg^{++} , siendo esta la mayor fuente de Ca^{++} (Calamera, 1977; Waites, 1977). La secreción de las vesículas seminales es rica en fructosa y prostaglandinas hidroxiladas, y presenta un bajo contenido de inositol y sorbitol. El fluido resultante contiene más K^+ y HCO_3^- que el de otras regiones del tracto masculino (Meizel y col., 1980; Mann y Lutwak-Mann, 1981; Harper, 1988).

El **espermatozoide**, por lo tanto, durante su pasaje experimenta cambios que le permiten ajustarse a las modificaciones del medio ambiente, llegando a la suspensión en el **plasma seminal**. El período de tiempo que permanece el espermatozoide en este fluido *in vivo* es muy corto ya que se han encontrado

espermatozoides en el oviducto tan solo 5 min después del coito (Harper, 1988; Yeung y col., 2003). Sin embargo, se desconoce cuanto modifica a la funcionalidad espermática la interacción con el **plasma seminal**. El fluido seminal humano presenta un valor de osmolalidad elevado (alrededor de 400 mOsm/kgH₂O) comparado con otros fluidos del tracto masculino y femenino (290 a 320 mOsm/kgH₂O). La **osmolalidad** total de este fluido está dada por las altas concentraciones de componentes orgánicos, además de los inorgánicos. Una vez producida la eyaculación, la **osmolalidad** del **plasma seminal** resulta conformada por la participación de moléculas tales como fructosa, sorbitol, inositol, bases nitrogenadas como colina y ergotionina, taurina e hipotaurina, prostaglandinas, serotonina y ácido cítrico, entre otros (Waites, 1977; Mann y Lutwak-Mann, 1981).

El **plasma seminal** contiene **enzimas** con características nucleolíticas, proteolíticas, fosfatasas y glicosidasas (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Harper, 1988). A estas enzimas se les atribuyen, entre otras acciones, la participación en la modificación de las moléculas de superficie adquiridas por el espermatozoide en el **epidídimo**. En el fluido seminal se encuentran presentes también **inhibidores proteolíticos** que podrían actuar como moduladores de las actividades de las enzimas presentes (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Harper, 1988). Entre las moléculas presentes en altas concentraciones en el **plasma seminal**, la taurina es un zwitterion con un pKa para su grupo ácido (SO₃) y para el grupo amino (NH₃) semejante al de los fosfolípidos de membrana, como la fosfatidil colina y la fosfatidiletanolamina (Cañas, 2002). En algunos tejidos se ha demostrado que la taurina puede presentar un rol importante en el cambio de algunas propiedades de la membrana, como la **fluidez**, la capacidad de **transporte de algunos iones** (la entrada de la taurina está asociada al K⁺) y la regulación de la actividad de algunas **enzimas** enlazadas a la membrana, así como también en la mantención del **potencial** de la **membrana** y el **pH intracelular**, y acción antioxidante por atrapar moléculas que podrían generar daño celular (Cañas, 2002).

Una vez eyaculado, el semen adquiere un estado semisólido gelatinoso, mal llamado coágulo, conformado mayoritariamente por semenogelina tipo I y II, el cual es digerido por enzimas fibrinolíticas del **plasma seminal** como la quimotripsina tipo proteasa de origen prostático (Yoyida y col., 2003). La licuefacción del semen se completa *in vitro* dentro de los 10 a 20 min post eyaculación y durante este proceso interviene una enzima denominada seminina así como varios factores proteolíticos de

origen prostático (Mann y Lutwak-Mann, 1981, Yoyida y col., 2003). La licuefacción seminal es parte de la evaluación de la **calidad seminal** y se relaciona con las características del **movimiento espermático**, tanto desde el punto de vista fisiológico como del fisiopatológico (Han y col., 1990; Maier y col., 1991; Yoyida y col., 2003; Yavas y Selub, 2004). Algunas variables fisicoquímicas como son pH y viscosidad del **plasma seminal** han sido estudiadas en relación a su influencia sobre el movimiento espermático (Carr y col., 1985; Mortimer y col., 1989).

A.8- El tracto reproductivo femenino

En el humano como en otras especies, el semen es depositado en la vagina cerca del canal cervical y el **espermatozoide** una vez liberado desde el coágulo, encuentra un medio hostil, el **fluido vaginal**, con un pH < 5. La liberación se consigue por la acción de las enzimas fibrinolíticas del **plasma seminal**, y entre los 5 a 10 min luego de la deposición, los espermatozoides migran hacia el **canal cervical** (Hafez, 1979). Esta primera barrera fisiológica al tránsito de los espermatozoides, es sorteada gracias a la capacidad buffer del plasma seminal que provee un tiempo corto, para que alcancen el **canal cervical** sin sufrir efectos debido al bajo pH (Harper, 1988). Los **espermatozoides** quedan nuevamente expuestos a ambientes fisiológicos con particularidades tales como: contracciones musculares, factores endocrinos, distintos tipos celulares (con sus particulares secreciones y absorciones), nutrientes e iones.

Los **espermatozoides** recorren el canal cervical, el útero, los oviductos, pudiendo llegar, aquellos que no interaccionen con el ovocito, hasta la cavidad peritoneal. Las características particulares del **tracto femenino** actuarán sobre la población de **espermatozoides**, en algunos casos facilitando el **transporte** en forma mecánica, en otros como fuentes de energía y nutrientes, y en muchos casos a modo de barreras o **selección** (Liu y Baker, 1992; Boatman, 1997; Miller y col., 2002).

El **espermatozoide** requiere de su **movimiento** para alcanzar el sitio de la **fecundación** y de la fuerza asociada al **movimiento flagelar** para penetrar las cubiertas ovocitarias. La superficie de las células epiteliales que recubren el tracto genital femenino, sus secreciones y las cubiertas ovocitarias modularían la **movilidad espermática**, coordinando el **transporte** y **unión** de los gametos femenino y masculino (Suarez, 1999; Cañas, 2002; Suárez y Pacey, 2006).

En el **canal cervical** los espermatozoides se contactan con una secreción polimérica de macromoléculas de mucina (un hidrogel) que es una glicoproteína con

más del 40% de carbohidratos; un componente soluble formado por sales inorgánicas (NaCl) y proteínas, glucosa, manosa, aminoácidos y lípidos (Elstein, 1974). El sistema fibrilar de glicoproteínas unido mediante puentes disulfuro entre cadenas polipeptídicas paralelas, posee suficiente espacio para el paso del **espermatozoide** cuando se encuentra en período periovulatorio, pero con una resistencia mecánica estructural al movimiento del espermatozoide (Katz y col., 1989; Barrat y Cooke, 1991; Wen y col., 1993). La consistencia varía con la secreción de hormonas ováricas (estradiol y progesterona), y es un fluido que también está presente en la secreción oviductal del istmo bajo y en el cúmulo oóforo (Elstein, 1974). Este proceso podría remover moléculas desde la superficie del **espermatozoide**.

El **transporte** se da en tres etapas: transporte inicial o rápido, comenzando la migración a través del cérvix, liberándose del plasma seminal, de restos celulares y leucocitos. En fase periovulatoria el **moco cervical** es óptimo para el pasaje de los espermatozoides que ascienden entre 2 ó 3 mm/min (Moghissi, 1981), con una velocidad de 25 $\mu\text{m/s}$ (Katz y col., 1989). Se ha estimado que accede al **moco cervical** 1 de cada 100 o de cada 1000 espermatozoides depositados en la vagina (Mitchell y col., 1976), por lo tanto la penetración del **moco cervical** ovulatorio dependerá de la cantidad depositada, de la motilidad y de la morfología de los espermatozoides (Mortimer y col., 1982; Katz y col., 1997). El pasaje es ayudado por contracciones uterinas y vaginales, pero la presencia de anticuerpos antiespermáticos podría afectar el desplazamiento (Wang y col., 1985; Alexander, 1989). Se consigue una distribución no homogénea, a través de los caminos con menor resistencia, eliminándose por filtración o fagocitosis de leucocitos los espermatozoides muertos, los morfológicamente anormales y el plasma seminal (Mortimer, 1994. **Figura 15**). Así, luego de la primera etapa de transporte rápido y selección de los **espermatozoides** morfológicamente normales, sobreviene la **colonización de reservorios**. La mucosa endocervical está formada por criptas, y solo los espermatozoides móviles consiguen entrar en ellas, permaneciendo protegidos de la fagocitosis de los leucocitos, por lo que actuarían como reservorios (**Figura 15**, Hafez, 1979).

Algunos **espermatozoides** alcanzan el oviducto en muy corto tiempo (5 min) después del coito, y muchos quedan retenidos en las criptas cervicales, desde donde solo los móviles son **liberados lentamente**. Así la tercera etapa o **liberación lenta**,

genera oleadas de **espermatozoides** que continúan ascendiendo por el tracto femenino un período prolongado de tiempo (Hafez, 1979).

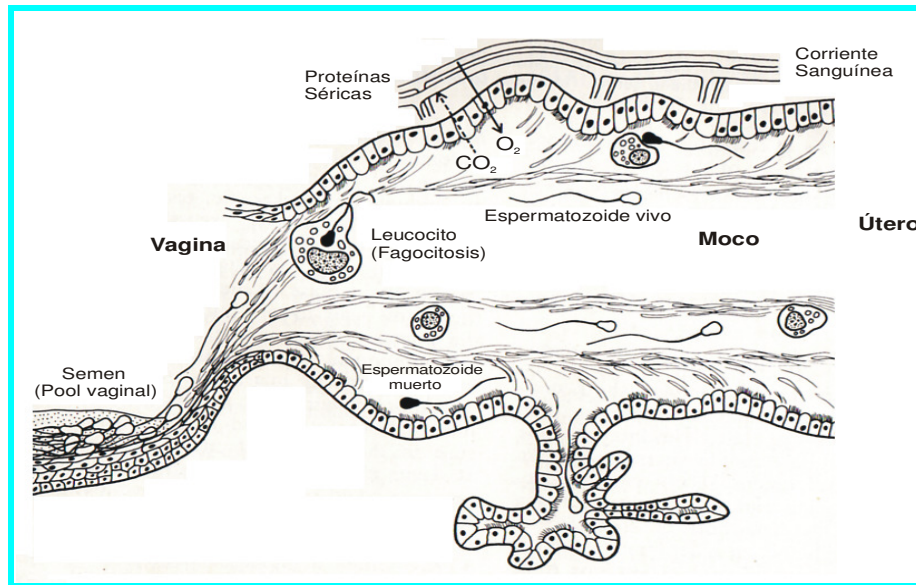


Figura 15: Transporte a través del canal cervical (tomado de Hafez, 1979).

Durante el paso de los **espermatozoides** a través del tracto genital femenino existirían además **interacciones** con las células que revisten su superficie o que se encuentran suspendidas en estos fluidos (Suarez y Pacey, 2006; **Figura 16**). Dichas interacciones dependerán de la afinidad que presente la superficie del espermatozoide por las moléculas de secreción de estas células. La glicodelina-S es la mayor glicoproteína presente en el **plasma seminal humano**, tiene un efecto “**decapacitante**” en los espermatozoides por reducir el eflujo de **colesterol** inducido por albúmina y ciclodextrina, lo cual suprime la **capacitación** (Chiu y col., 2005). Esta claro que el espermatozoide epididimario esta protegido contra la **capacitación prematura**, que el **plasma seminal** contiene estimuladores e inhibidores de la capacitación, y que el tracto femenino puede **prevenir** o **reforzar** ambos efectos en la **capacitación**, así como asegurar la disponibilidad de un número suficiente de **espermatozoides funcionales** una vez producida la ovulación cuando el ovocito alcanza el **ámpula** (Bailey, 2010).

Durante el pasaje de los **espermatozoides** se pueden remover factores de “**decapitación**” de su superficie, promovándose la **capacitación** (Yanagimachi, 1998). Entre los **factores decapacitantes** mejor caracterizados, se encuentran las proteínas bovinas del plasma seminal (BSPs; o Binder of SPerm family), que se unen

a fosfolípidos en residuos colina, luego secuestrados del **espermatozoide** por heparina u otros componentes del tracto genital (vaca), llevándose junto a ellos lípidos de membrana como colesterol y fosfolípidos (Therien y col., 1998).

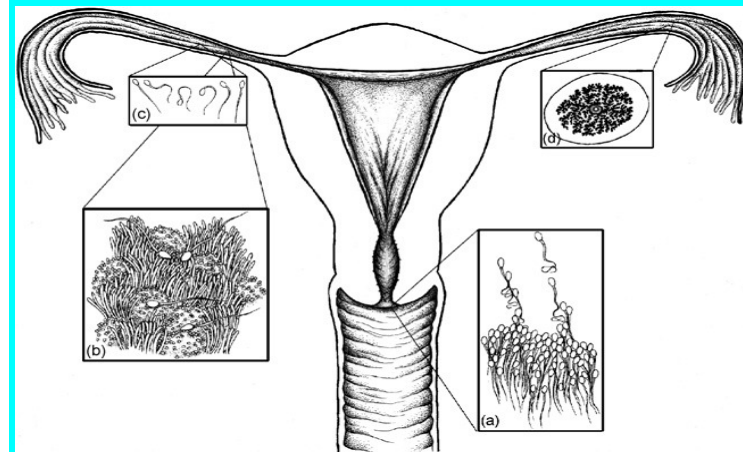


Figura 16: Estadios del transporte espermático a través del tracto reproductivo femenino humano: (a) espermatozoides entrando al moco cervical, zona externa del cerviz, se esquematiza la progresión de algunos espermatozoides a través de la microestructura del moco; (b) espermatozoides interactuando con epitelio endosalpíngeo; (c) espermatozoides con motilidad HA que los libera del epitelio y continúa la progresión hacia el ovocito; (d) complejo cúmulo-ovocito dentro del ampolla (tomado de: Suárez y Pacey, 2006).

Una vez que los **espermatozoides** han alcanzado la **cavidad uterina** se induciría una respuesta de los leucocitos endometriales para fagocitar un número probablemente excesivo de **espermatozoides** por lo que es difícil encontrarlos luego de 24 h post coito (Hafez, 1979; Harper, 1988). Las contracciones del miometrio uterino son fundamentales para el ascenso de los espermatozoides hacia el oviducto, lo cual ayudaría a propulsar a los espermatozoides hacia la **unión útero-tubaria** (Hafez, 1979). En el momento de la ovulación, la secreción endometrial contiene una variedad de proteínas entre ellas: albúmina, prealbúmina, transferrina y post-transferrina, siendo la **osmolalidad** de este fluido de 290 mOsm/kgH₂O y no presenta variación importante a través del ciclo (Leese 1988). La concentración total de cationes en el fluido uterino es menor que en el plasma sanguíneo, entre estos el **K⁺** es mayor y el **Na⁺** y **Ca⁺⁺** menor que en plasma sanguíneo. La concentración del **K⁺** y **Ca⁺⁺** son menores en mitad del ciclo que es cuando el volumen del **fluido uterino** es mayor. A este ambiente migran, en el momento de la ovulación, neutrófilos,

macrófagos y linfocitos así como células epiteliales no nucleadas, algunas de ellas para fagocitar espermatozoides muertos (Harper, 1988).

Independientemente de la cantidad de **espermatozoides** que llegan al útero, el número que alcanza el **oviducto** permanece constante (Harper, 1988; Yanagimachi, 1988). La unión útero tubaria conforma la segunda barrera al ascenso de los **espermatozoides**, llegando al oviducto sólo en un pequeño número, siendo funcional a una selección debido a que el esfínter muscular reduce la luz, regulando el paso de los espermatozoides anómalos (Hafez y Black, 1969). Los espermatozoides con **motilidad progresiva pero no hiperactivados**, pasarían la unión seleccionándose (Shalgi y col., 1992). Es posible que los espermatozoides con **capacidad fecundante**, sean aquellos que pasan gradualmente la **unión útero tubaria** y acceden lentamente al **ámpula** (Overstreet y Cooper, 1978). Mediante estudios de proteómica se ha determinado que la presencia de espermatozoides en el **oviducto** generan una respuesta diferente del órgano sobre sus secreciones, sugiriendo que existe un sistema de reconocimiento capaz de distinguir entre espermatozoides y ovocitos (Georgiout y col., 2005).

Debido a que espermatozoides liberados del almacenamiento durante la ovulación llegan al **ámpula ovulatoria** en minutos, se ha estudiado la quimiotaxis en el proceso de migración espermática (Barratt y Cooke, 1991) y se la relaciona con cambios en la **superficie** del **espermatozoide**. Si bien los sitios de unión en el **oviducto** no cambian a lo largo del ciclo hormonal, existirían productos de secreción regulados hormonalmente que estimularían la **capacitación** y la **HA** (Suarez, 1999). La distribución no uniforme de espermatozoides en ambas trompas (> número en ámpula de trompa ovulatoria) sugiere la existencia de un proceso de atracción generado a partir del ovocito (Williams y col., 1993). Los mecanismos quimiotácticos que se han conseguido evidenciar son la atracción del espermatozoide al ovocito o al **FF** (Eisenbach, 1999) y estaría ligado a la progesterona (Teves y col., 2009), el hecho de que sólo una subpoblación responde al mecanismo, en el humano 2-12% de los espermatozoides, se asociaría con la **población capacitada** que sería la capaz de responder a las señales ovocitarias (Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994; Cohen-Dayag y col., 1995).

Una vez en el **oviducto**, la actividad contráctil de las Trompas de Falopio facilita el transporte espermático hasta el sitio de la **fecundación** (Hafez, 1979; Geneser, 1984). El estado hormonal de la mujer afecta a: estructura, actividad

secretora y de la musculatura oviductal, calidad y cantidad de productos de secreción y patrón de transporte de ambas gametas, así como la fecundación y los primeros clivajes embrionarios (Syrop y Halme, 1987; Smith y col., 1987; Yanagimachi, 1988; Barrat y Cooke, 1991; Smith y Yanagimachi, 1991; Mortimer, 1994). El **oviducto** presenta poblaciones celulares distintas, influenciadas por las hormonas ováricas secretadas durante el ciclo menstrual: en el istmo predominan células **secretoras** y en la fimbria y ámpula células **ciliadas**, y todas ellas aportan sustancias al fluido mediante sus secreciones siendo el mayor aporte la **transudación mucosa** (máxima en la mitad del ciclo, estimulada por estrógeno) (Hafez, 1979; Pauerstein y Eddy, 1979; Eddy y Pauerstein, 1980). En la **secreción oviductal** están presentes α y β -globulinas, K^+ y Cl^- en alta concentración, Ca^{++} en baja concentración, mientras que Na^+ y Mg^{++} mantienen la concentración del plasma sanguíneo (Leese y col., 2001). Las enzimas amilasa y lactato-deshidrogenasa actuarían convirtiendo el glicógeno en piruvato y glucosa, siendo el piruvato esencial para el desarrollo embrionario y la glucosa como fuente de energía para el espermatozoide (Harper, 1988; Lesse, 1988; Leese, y col., 2001). La **mucosa oviductal** protegería al **espermatozoide** durante el almacenamiento debido a la presencia de componentes químicos específicos, con probada actividad moduladora de las gametas, como el HCO_3^- (Okamura y col., 1985), la progesterona (Boatman, 1997) y la taurina e hipotaurina (Cañas, 2002) que además lo protegen del daño peroxidativo. El epitelio **oviductal** también secreta en forma estrógeno-dependiente, proteínas específicas denominadas oviductinas (Malette y col., 1995) cuya función sería la de facilitar la **unión** entre ambas gametas (Boatman, 1997). El **fluido oviductal** presenta una **osmolalidad** entre 289 y 290 mOsm/kgH₂O según la fase del ciclo ovárico (Lesse, 1988). Normalmente en el oviducto se encuentran unos 200 espermatozoides entre 2 y 34 h luego del coito (Harper, 1988). Los espermatozoides al llegar al **oviducto** se distribuyen en **dos fases** distintas: los rápidamente transportados a la región del **ámpula** y una segunda fase en la cual los espermatozoides permanecen en el **istmo**. Se ha asignado al **oviducto** una función de **reservorio**, ligada a prevenir la polispermia, permitiendo el ascenso de una cantidad limitada de espermatozoides. Las condiciones que hacen pensar en esta función de **reservorio** son: un mecanismo de **almacenamiento**: pequeña luz tubaria que restringe el desplazamiento aumentando la **unión** al epitelio; presencia de **moléculas** que al aumentar la **viscoelasticidad** de la secreción oviductal suprimirían la motilidad; **moléculas** presentes en la cabeza del

espermatozoide, tipo lectina, que reconocerían residuos de azúcares en el epitelio oviductal, favoreciendo la unión a las células ciliadas del oviducto modulando el pasaje (Hunter, 1987; Smith y col., 1987; Suarez, 1999; Bosch y Wright, 2005). Se ha postulado que la **afinidad electroquímica** de algunas moléculas en la superficie del gameto masculino constituiría una nueva fuente de resistencia, debido a que al unirse nuevas moléculas a la superficie del **espermatozoide** por afinidad electrostática se generarían **cambios** en la **carga neta** de la **superficie**, con lo cual permanecerían **unidos** a la superficie del epitelio (Katz y col., 1989). La liberación por un cambio en sus características, producido como consecuencia de la **capacitación**, lo lleva a asumir en esta etapa un **patrón de movimiento** más vigoroso (Katz y col., 1989). Debido a esto, el **istmo** se convierte también en un **reservorio** desde donde se liberarían lentamente los espermatozoides en dirección al **ámpula** (Aitken, 1990; Leese, y col., 2001; Suarez y Pacey, 2006).

El **oviducto** por lo tanto, mantendría la **capacidad fecundante** hasta el momento de la ovulación, regulando la **capacitación** y **movimiento HA**. En algunos casos, como es a nivel del **cúmulo oóforo**, las condiciones de elasticidad son más importantes que las de viscosidad y la respuesta del espermatozoide se manifestará principalmente en los cambios presentes en la **amplitud del batido flagelar** más que en la frecuencia del batido (Katz y col., 1989). Es por esto que se considera que el **oviducto** provee **espermatozoides** en el estado adecuado en el momento de la **ovulación**. En esta porción del tracto se dan los cambios importantes para la funcionalidad del espermatozoide que ya se han descrito, entre los que se pueden citar la **desestabilización** de la **membrana plasmática** de la **cabeza** del espermatozoide sin que se aprecien cambios en su morfología y cambios en el **patrón del movimiento**, (Aitken, 1990; Leese, y col., 2001; Suárez y Pacey, 2006).

Debido a su fácil obtención durante los tratamientos de reproducción asistida, el **fluido folicular (FF)**, es el más estudiado, comprobándose su efecto inductor sobre la **capacitación**, la ocurrencia de la **RA**, la **motilidad espermática**, la **HA** y la **quimiotaxis** (Tesarik 1985; Calvo y col., 1989; Eisenbach, 1999; Munuce y col., 2000; Cañas, 2002). El efecto inductor del **FF**, es atribuido al componente esteroideo (Mbizvo y col., 1990), donde la progesterona y la 17-hidroxiprogesterona, constituyen el componente activo inductor de la **RA** (Osman y col., 1989; Blackmore y col., 1990; Teves y col., 2009). Sin embargo, se ha visto que *in vitro*, cuando en el medio de incubación se encuentra presente **FF** se inhibe la unión a la ZP (Qiao y col., 1998;

Yao y col., 1998; Munuce y col., 2004). Por otro lado, la **activación** del **espermatozoide** requiere modificaciones en su entorno controladas por una llave de acceso, presente en el **tracto reproductivo femenino**, que regula la actividad del espermatozoide según la **ubicación** dentro del tracto y depende de la **fase del ciclo menstrual** (Kirichok Y. y Lishko P., 2011). Así las llaves que pueden **activar** los **canales iónicos** son la **progesterona** liberada por los ovarios y las células del **cúmulo** que rodean al ovocito, **glicoproteínas** de la **ZP** y la **albúmina** que es la mas abundante de las proteínas del fluido oviductal (Publicover y col., 2007; Kirichok Y. y Lishko P., 2011).

El efecto protector del **oviducto** presenta alguna controversia. Algunos trabajos muestran que cuando los espermatozoides son incubados *in vitro* con células oviductales, presentan una sobrevivida mayor que en ausencia de estas células (Kervancioglu y col., 1994). También se ha observado que el co-cultivo prolonga la **motilidad espermática** (Young y col., 1994), promueve la **capacitación** y la **unión** a la **ZP** (Pacey y col., 1995; Yao y col., 1999). Sin embargo, otros autores no han observado efecto alguno sobre la **motilidad espermática** (Bastias y col., 1993). En nuestro laboratorio se ha determinado que las células oviductales secretan en cultivo proteínas sintetizadas *de novo*, alguna de las cuales, luego de ser separadas, se unen a los **espermatozoides**. Sus pesos moleculares son variables, como las de 14, 79, 95 y 127 kDa y al ser agregadas a los **espermatozoides**, mejoran su sobrevivida y motilidad (Quintero y col., 2005). Además, se determinó que el medio condicionado que secreta el tejido oviductal en cultivo, al ser agregado a los **espermatozoides capacitados**, no afectó ni la motilidad ni la viabilidad de los mismos, aunque se modificó la capacidad de respuesta frente al ionóforo de Ca^{++} , inductor no fisiológico de la **RA** (Quintero y col., 2005), y además disminuyó la afinidad por unirse a la ZP (Munuce y col., 2008). Determinamos que la presencia de proteínas de dicho medio condicionado, disminuyó de manera dosis dependiente, la **capacitación espermática** estimada mediante la fosforilación y la RA (Zumoffen y col., 2010).

La progresiva eliminación de **espermatozoides** durante el pasaje por el tracto reproductivo femenino, lleva a que los pocos espermatozoides que llegan al **oviducto** posean un alto **potencial fecundante**. El ambiente ampular, además de estar embebido de **fluido oviductal**, recibe el aporte de fluidos de otros espacios, como son **el fluido peritoneal (FP) y FF**, ya que la trompa es un órgano abierto hacia el peritoneo. Los **espermatozoides** pasan a través del **oviducto** y muchos de ellos

llegan al infundíbulo alcanzando la cavidad peritoneal. La participación del **FF** y el **FP** y su capacidad de modular la función espermática ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Nuestros resultados mostraron que cuando los **espermatozoides capacitados** se exponen al **FP** en concentración superior al 20% v/v, no sólo no se consiguió inducir la **RA**, a diferencia de lo que ocurre con el **FF**, sino que el pre-tratamiento con **FP**, inhibe la capacidad de los espermatozoides de responder a la inducción por **FF**, sin afectar **sobrevida**, **motilidad** ni estado de **capacitación** de los mismos (Munuce y col., 2003). El nivel de progesterona en el **FP** es 100 veces inferior al del **FF** y al equilibrar la progesterona a nivel comparable con el del **FF**, le confiere al **FP** la capacidad inductora de **RA** (Munuce y col., 2006). Sin embargo, **espermatozoides** pre-tratados con **FP** previo a exponerlos a progesterona, la hormona no estimula la **RA** y el efecto “inhibitorio” del **FP** no se revierte por lavado (Caille y col., 2012). En presencia de **FP**, y utilizando **FF** como control, disminuyen significativamente la **capacidad fecundante** de los espermatozoides, estimada mediante **RA** inducida por ionóforo, la expresión de sitios de unión para azúcares de la **ZP**, y el número de espermatozoides unidos a **ZP** humana (Munuce y col., 2003, 2004).

A.9- Adquisición de capacidad fecundante: cambios que experimenta el espermatozoide en los distintos ambientes del tracto reproductivo masculino y femenino

Como ya fue expresado anteriormente, la interacción del **espermatozoide** con los distintos ambientes que atraviesa, genera **cambios morfológicos y funcionales**, determinantes para la adquisición y expresión de su **capacidad fecundante**. El **potencial fecundante** del espermatozoide dependerá de la capacidad de adaptarse funcionalmente a los cambios que se le presenten.

En el testículo las células espermatógenicas proliferan y mediante el proceso de diferenciación se transforman de espermátida a espermatozoide, se condensa la cromatina nuclear y evolucionan el acrosoma, la vaina mitocondrial, el cuello y el flagelo. El estadio final de la condensación cromatínica se debe al reemplazo de histonas de tipo somático por histonas básicas específicas del espermatozoide (protaminas) (Kvist, 1980; Björndahl y Kvist, 1990). Al neutralizarse las fuerzas electrostáticas de repulsión, debido a la característica básica de las protaminas, se condensa el material genético en la molécula de ADN resultando en una mayor

compactación. Finalmente se incorpora Zn^{++} que se une fuertemente a los grupos -SH de los residuos cisteína de las histonas nucleares, quedando una estructura de tipo -S-S-Zn-S-S- (Kvist, 1980; Kjellberg y col., 1992; Kosower y col., 1992).

Durante la **espermiogénesis**, en el testículo, se establecen **dominios** en la superficie de las **membranas** de las células espermáticas, con una polarización por **migración** y **anclaje** de componentes de **membrana** (proteínas integrales) con componentes del **citoesqueleto**, resultando en una restricción de estos dominios (Carr y col., 2001; Carr y Newell, 2007; Newell y col., 2008). Durante el paso por los **conductos testiculares**, se modifica la membrana plasmática de los espermatozoide debido a cambios en la **composición lipídica** y **adsorción** de **moléculas** tales como antígenos, glicoproteínas y ácido siálico, entre otras (Eddy, 1988; du Plessis y col., 2011). Estos cambios modifican las cargas negativas netas de la superficie celular (Yeung y col., 2003; Navarro y col., 2008). Una característica morfológica importante de los espermatozoides testiculares, es que presentan la denominada **gota citoplasmática**. Esta estructura esférica, ubicada en la porción proximal de la pieza intermedia, debajo de la cabeza del espermatozoide, está compuesta por túbulos finos y curvados y gran cantidad de vesículas transparentes de tamaños variados, las que difieren en forma y cantidad de la gota protoplasmática presente en los espermatozoides epididimarios (Cooper y Yeung, 2003; Fetic y col., 2006; **Figura 17**).

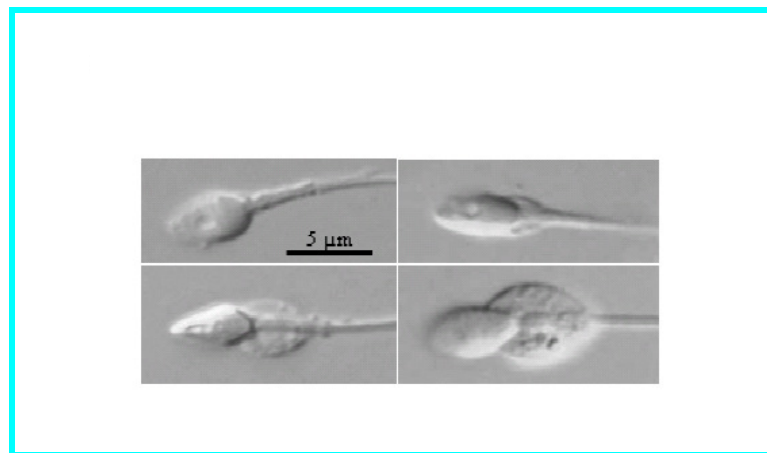


Figura 17: Gota citoplasmática. Micrografía diferencial de interferencia de espermatozoides sin (panel izquierdo arriba) y con presencia de gota citoplasmática de diferentes tamaños, en la pieza media del flagelo luego de 80 min de penetración de moco cervical. Las gotas más pequeñas son las más frecuentemente encontradas (tomado de Fetic y col., 2006).

Luego de la **espermiación**, los espermatozoides, en su paso por el **epidídimo**, experimentan la "**maduración epididimaria**". Este proceso de modificación de la superficie espermática involucra a **epididimosomas** presentes en gotas apicales provenientes del epitelio epididimario, que transportan moléculas y factores que interactuarán con el espermatozoide (Sullivan y col., 2007). Los nuevos cambios en la superficie del espermatozoide incluye la **adsorción** de **macromoléculas**, especialmente glicoproteínas, que se incorporarían a la membrana con la participación de enzimas presentes en el fluido epididimario como la galactosiltransferasa y la sialiltransferasa (Eddy, 1988; du Plessis y col., 2011). Esto genera un aumento de las cargas negativas en la superficie de la **membrana plasmática**, evidenciándose además cambios por **absorción**, con la posible integración de carnitina, acetilcarnitina y glicerilfosforilcolina (Eddy, 1988).

La **composición lipídica** de las **membranas** del espermatozoide es fundamental para el desarrollo de sus **características funcionales**. La variación en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos divide subpoblaciones de espermatozoides humanos, donde las diferencias en cabeza y cola se relacionarían con **madurez espermática** y con diferencias en la **función fisiológica** de los mismos (Zalata y col., 1998). De acuerdo con el modelo del "mosaico fluido" de las membranas biológicas, las proteínas y/o glicoproteínas están asociadas de modo no covalente a la bicapa fosfolipídica. Hay proteínas firmemente unidas (intrínsecas), otras periféricas que son las adsorbidas en el **epidídimo** y que se remueven fácilmente, lo cual será fundamental luego, durante el progreso de la **capacitación** (Yanagimachi, 1988; du Plessis y col., 2011). Los cambios en la composición de proteínas y lipoproteínas debido a **enmascaramiento** o **desenmascaramiento** de componentes de superficie, genera la disminución en el contenido de colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol; y el aumento en el contenido de diacilglicerol (DAG), sulfato de colesterol, dermatosterol, fosfatidilcolina, esfingomielina y polifosfoinositidos entre otros (Eddy, 1988; Turner, 1995; Zalata, y col., 1998). Estas modificaciones en la **membrana espermática** determinan cambios en sus propiedades tales como: unión a lectinas, fluidez, reducción en la superficie de grupos -SH y cambios en la actividad ATPásica en la superficie espermática (Turner, 1995; Zalata, y col., 1998). Se vuelve a considerar la acción de la hipotaurina, como antioxidante, participando en mantener la integridad de las proteínas de membrana de los espermatozoides, con lo que actúa protegiendo la **motilidad** frente a la acción de

leucocitos polimorfonucleares activados, presentes en el semen (Cañas, 2002). Asociado al proceso de **maduración epididimaria**, se ha observado una redistribución de partículas intramembranas (Turner, 1995; Zalata, y col., 1998). El **colesterol**, limita la **permeabilidad** a iones, la inserción de proteínas y su movilidad dentro de la bicapa fosfolipídica y **estabiliza** las membranas, previniendo la **capacitación prematura**; por lo tanto su eflujo y/o redistribución permiten la **desestabilización** de la membrana y por ende la **capacitación** (Davis y col., 1979; Davis, 1980).

La estabilización de la cromatina nuclear condensada es un cambio de fundamental importancia durante la **maduración epididimaria**, y se produce al establecerse puentes disulfuro (-S-S-) entre los grupos tioles (-SH) de los residuos cisteína en las protaminas espermáticas. Durante el **tránsito epididimario**, el espermatozoide pierde cierta cantidad del Zn^{++} adquirido en el testículo, debido posiblemente a una disminución en el pH del fluido epididimario; y que se renueva durante la eyaculación por Zn^{++} de origen prostático (Kvist, 1980; Rosenborg y col., 1990; Sullivan y col., 2007). La estabilización de la cromatina es crucial para el proceso de fecundación, debido a que debe llegar inalterada al ovocito y al mismo tiempo ser fácilmente accesible luego de la penetración de los espermatozoides al citoplasma ovocitario (Rosenborg y col., 1990; Kosower y col., 1992; Liu y Baker, 1992).

En el epidídimo se estabilizan además por puentes -S-S- componentes de la cola, como son la vaina fibrosa y fibras externas (Sullivan y col., 2007). Una consecuencia importante del proceso de **maduración**, es el desarrollo de la capacidad de mantener un **patrón de movimiento** de características **progresivas** debido a la activación del flagelo, como ya fue explicado anteriormente (Yanagimachi, 1981 y 1988; Bedford, 1983; Eddy, 1988).

Los espermatozoides en contacto con el **plasma seminal** experimentan nuevas modificaciones en su superficie, entre los que se incluyen: la **adsorción** a la membrana de macromoléculas, como son los llamados **factores decapacitantes**, el antígeno HLA y diversos factores inmunosupresores. Como consecuencia de esta modificación de la superficie se **alteran** las **cargas** de superficie y los **sitios de unión** a **lectinas** (Eddy, 1988; Gwathmey y col., 2003). Algunos antígenos de la membrana del espermatozoide se redistribuyen durante la **capacitación** (Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994), pero su rol funcional se ha establecido en muy pocos casos, como

para las **moléculas de adhesión** como fibronectina, vitronectina y laminina con una función asociada a la **unión a la ZP** (Fusi y Bronson, 1992; Fusi y col., 1992).

En las secreciones de las glándulas accesorias hay factores que se describen como iniciadores o amplificadores de la **motilidad espermática**, como son entre otros: sustancias que actuarían como nutrientes y factores catalíticos de naturaleza proteinasa, algunas de origen prostático (Melendrez y col., 1992; Cañas, 2002; Yoyida y col., 2003). Se definen, además otros agentes inespecíficos como son el pH, la concentración de iones y otras moléculas que podrían intervenir activando el **patrón de movimiento** (Melendrez y col., 1992; Cañas, 2002).

En la **Figura 18** se presentan resumidos los cambios e interacciones que sobrelleva el espermatozoide una vez que ingresa al **tracto reproductivo femenino**.

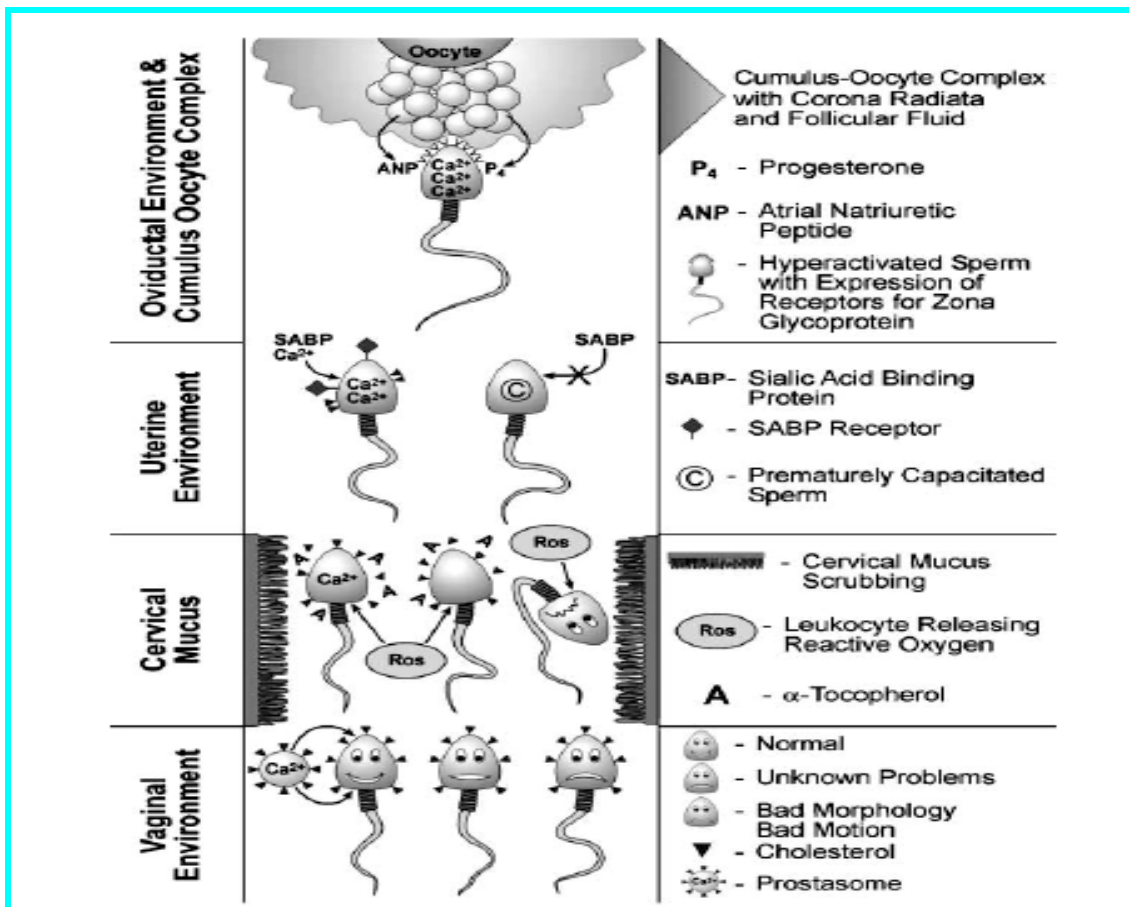


Figura 18: Cambios e interacciones que experimenta el espermatozoide humano en su paso por el tracto reproductivo femenino (tomado de de Jonge, 2005).

Cabe destacar que, debido al intercambio de moléculas a través de las membranas, el **espermatozoide** consigue **regular** su **volumen**, y esta capacidad

aumenta, durante el **tránsito epididimario**, hacia **cola** del **epidídimo** (Yeung y col., 2003, 2005a,b; Fetic y col., 2006; Klein y col., 2006).

A.10- Regulación del volumen espermático

Los fluidos fisiológicos a los cuales están expuestos los espermatozoides durante su transporte, hasta el sitio de la fecundación, presentan una **osmolalidad** variable como se ha determinado para el **fluido testicular** de 280 mOsm/kg, para el **epididimario** y **plasma seminal** de alrededor de 400 mOsm/kg y para el **uterino** de fase ovulatoria de 284 mOsm/kg (Casslén y Nilsson, 1984; Caille, 1996; Björndhal y Kvist, 2003; Cooper y col., 2005). El espermatozoide debe **regular** su **volumen** al migrar desde un medio de una **osmolalidad mayor**, como el plasma seminal, y pasar a fluidos de **menor osmolalidad** como son el uterino y el tubario. Es posible que este cambio genere en el espermatozoide un **stress hipoosmótico**, que tratará de contrarrestar intercambiando **agua** y **moléculas osmóticamente activas** (Cañas, 2002; Yeung y col., 2003, 2006). En distintos sistemas celulares, la taurina, presente en el plasma seminal y en alta concentración en el FF, cambia la permeabilidad del agua y regula las condiciones de **isoosmolalidad** de las células, especialmente con los iones con los cuales interactúa (Cañas, 2002). Así, la taurina, al regular la permeabilidad, produce cambios en el **volumen celular** (Cañas, 2002).

Es necesaria una **regulación** del **volumen espermático** luego de la eyaculación, por lo cual, un defecto en la **capacidad regulatoria** implicaría un stress osmótico que desencadenaría una falla en el traspaso del **canal cervical** (Yeung y col., 2003; Petrunkina y col., 2004; Yeung y col., 2005a,b; Cooper y Barfield, 2006; Klein y col., 2006; Yeung y col., 2006). Se ha determinado que existe una relación entre el tamaño de los espermatozoides (volumen) y la cinemática de su movimiento (Yeung y col., 2003; Fétic y col., 2006). Dado que el **volumen espermático** esta influenciado por el **equilibrio** del líquido a través de sus membranas (Yeung y col., 2003, 2005), un defecto en su regulación podría derivar en un daño permanente que conduciría a una falla en los mecanismos de **capacitación** y **fecundación**.

Se han estudiado los mecanismos fisiológicos de la regulación del **volumen espermático** a través de canales iónicos, para evaluar si un defecto de los mismos explicaría su participación en la infertilidad (Yeung y col., 2002, 2003, 2004a,b, 2005a,b; Barfield y col., 2005; Zhang y Gopalakrishnan, 2005; Klein y col., 2006). En esta línea de investigación se ha determinado que el **citoesqueleto** debe permanecer

intacto para responder al requerimiento de **regulación** del **volumen** durante la **capacitación espermática** (Petrunkina y col., 2004).

Durante el manejo *in vitro* en las técnicas de **reproducción asistida**, los espermatozoides móviles son extraídos del plasma seminal y resuspendidos en medios de cultivo, los cuales no resultan **isoosmolales** al **plasma seminal**, ya que los medios utilizados en el manejo *in vitro* de las gametas (HTF, Ham F10, entre otros) poseen una **osmolalidad** cercana a 280 mOsm/kg. Menos **isoosmolal** aun es el caso del uso de **crioprotectores**, durante la criopreservación de espermatozoides en nitrógeno líquido, los cuales presentan **osmolalidad** de hasta 3000 mOsm/kg,

A.11- El ión K^+ y su participación en los procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo femenino

El ión K^+ cumple una función importante en la génesis y regulación de los desequilibrios del metabolismo ácido-base, por su estrecha relación con el movimiento de H^+ , Na^+ y agua a través de las membranas plasmáticas de los distintos tipos celulares (Mudge y Weiner, 1991). Los sistemas activos para el transporte de iones mantienen un elevado gradiente de K^+ a través de las membranas. Las concentraciones de H^+ y K^+ **intracelulares** ($[H^+]_i$ y $[K^+]_i$) son mayores que en el fluido extracelular. Cuando aumenta la concentración de H^+ extracelular se genera un desplazamiento de K^+ desde la célula hacia el compartimiento extracelular y viceversa. Si se modifica la concentración de K^+ la distribución de H^+ también puede verse afectada, lo mismo ocurre si aumenta el K^+ **extracelular**, se regulará la **electroneutralidad** a través del H^+ y del Na^+ .

Existen gradientes de concentración que impulsan flujos pasivos de Na^+ hacia el interior y K^+ hacia el exterior de la célula. Para el K^+ la fuerza del gradiente de concentración tiene sentido opuesto que el generado por el **potencial de membrana** (por el contrario para el Na^+ el sentido es el mismo) así el **potencial electroquímico** del K^+ **intracelular** es mayor que el de K^+ **extracelular**.

El mantenimiento de las concentraciones de estos iones, es importante desde el punto de vista fisiológico en la conservación del **volumen celular**, en la **activación** de **enzimas** intracelulares donde el K^+ interviene en su funcionamiento, en la generación de **potenciales eléctricos**, en el **transporte** de otras moléculas por **cotransporte** y **contratransporte** (aminoácidos y glucosa en el primer caso y salida de Ca^{++} en el segundo), en la **recuperación celular** luego de la excitación y en el

transporte transepitelial de solutos y agua. El **transporte activo** de **Na⁺ y K⁺** está mediado por una Na⁺,K⁺-ATPasa ubicada en la membrana plasmática. Debido a que se transportan números desiguales de **Na⁺ y K⁺**, durante el intercambio, se da una relación de **3Na⁺/2K⁺**, y esto genera una corriente de cargas positivas hacia el exterior incrementando la **electronegatividad intracelular** (Garrahan y Regan, 1988).

Es por todo lo expuesto que el **K⁺** podría participar en los procesos de **maduración espermática, capacitación, RA y fecundación**. La alta concentración de **K⁺** presente en el **fluido epididimario** podría ser la causa de la inmovilidad que presentan los espermatozoides en ese ambiente, así como, una alta concentración de **K⁺** en el plasma seminal se correlaciona negativamente con el porcentaje de espermatozoides móviles en el eyaculado (Gusani y col., 1992). En los espacios biológicos del tracto reproductivo femenino la concentración del **K⁺** varía en un amplio rango (14 a 27 mM en el plasma seminal; 15 mM en el canal cervical; 20 a 26 mM en el fluido uterino según el ciclo ovárico; 18 a 30 mM en el tubario; 3,5 mM en el FF y 4 mM en el peritoneal) (Casslén y Nilsson, 1984; Leese, y col., 2001).

También se ha asignado especial importancia a la **concentración** de **K⁺** y a la relación **Na⁺/K⁺** en los **medios** utilizados en incubaciones de gametos y embriones, remarcándose el beneficio de usar un medio basado en la composición del **fluido tubario** en la fecundación *in vitro* (Quinn y col., 1985; Lesse, 1988; Leese, y col., 2001). Es probable que la concentración de **K⁺** mantenga los niveles de **K⁺ intracelular**, requeridos para la adquisición de la **capacidad fecundante** (Toyoda y Chang, 1974).

Los cambios en la concentración de **K⁺ extracelular** alteran la concentración de **K⁺ intracelular**, influyendo de esta manera en el transporte de electrolitos, en el consumo de O₂, en la actividad de enzimas glicolíticas, en la síntesis de macromoléculas y en la polarización de la membrana celular (Borland y col., 1977; Roblero y Riffo, 1986; Lesse, 1988). El **K⁺ extracelular** es necesario para el éxito de la **fecundación** y sólo se requiere el **K⁺ extracelular** en las etapas finales de la capacitación (ratón, Roblero y Riffo, 1986). Una baja relación **Na⁺/K⁺** afecta la motilidad de espermatozoides dependiendo del pH (Lesse, 1988). Por otra parte, el **aumento** en la concentración del **K⁺** sería responsable de la quiescencia de los espermatozoides en el oviducto (Pholpramool y Chaturapanich, 1979; Fraser, 1984; Burkman y col., 1984). Es posible que el estado fisiológico de los espermatozoides presentes en el istmo amplifique la **sensibilidad** al **K⁺** o bien que este ión actúe

aumentando o deprimiendo la actividad flagelar inducida a través de otros mecanismos. Se ha descrito en ratón la participación de canales de Ca^{++} en el desarrollo del movimiento **HA** (Qi y col., 2007). En algunas especies, se postula la presencia de **canales de K^+** , dependientes de Ca^{++} , en otras activados por péptidos del ovocito previo al contacto entre gametos, y también se ha postulado que la **despolarización** de la membrana activaría a los **canales de Ca^{++}** voltaje dependientes (Llanos y Riffo, 1989; Florman y col., 1992).

Una alta concentración de K^+ (25 mM) aumenta, en humanos, el porcentaje de espermatozoides **vivos y acrosoma reaccionados** en condiciones *in vitro* y estimula la capacidad de los espermatozoides de **penetrar ovocitos** de hámster, efecto que se visualiza a partir de las 10 hs de incubación (Roblero y col., 1988 y 1990).

Es importante destacar que, *in vivo*, las diferentes condiciones físico-químicas no ejercerían un efecto directo sobre el espermatozoide sino que estarían **modulando la función del espermatozoide** a través de la regulación de sus **vías metabólicas** (Fraser y Ahuja, 1988).

La **Figura 19** ilustra las bombas, canales y reservorios intracelulares que podrían encontrarse presentes en los **espermatozoides** de mamíferos y sus posibles localizaciones, que contribuirían a la regulación del **Ca^{++} intracelular (Ca^{2+})_i**. La localización aproximada indica la presencia en cabeza, pieza media y principal o en organelas intracelulares. El signo de pregunta en SERCAs indica la presencia o significancia funcional aun controvertida. Las mitocondrias en la pieza media, que acumulan Ca^{++} dentro del espacio de la matriz no se muestran para no hacerlo poco claro (Publicover y col., 2007).

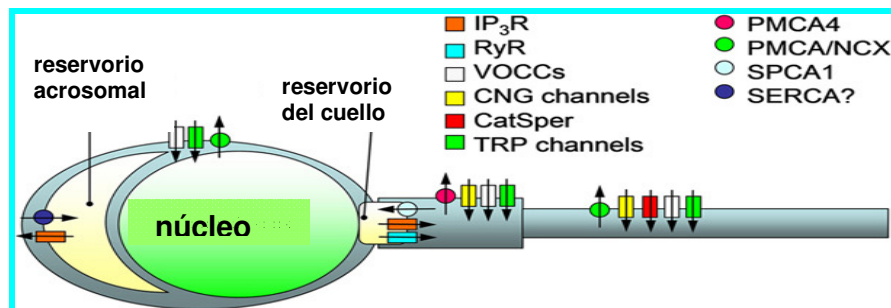


Figura 19: Regulación del (Ca^{2+})_i en espermatozoide de mamíferos. Componentes: rectángulos indican canales, círculos indican bombas, las flechas indican la dirección normal del movimiento del Ca^{2+} (tomado de Publicover y col., 2007).

Una reducción de la $[H^+]_i$ y la elevación de la $[Ca^{++}]_i$, se consigue fácilmente ya que existe un abrupto gradiente de concentración para H^+ y Ca^{++} a través de la membrana plasmática. La apertura de los canales iónicos de H^+ y Ca^{++} presentes en la membrana plasmática del **espermatozoide** sería suficiente para alcanzar la salida de H^+ y la entrada de Ca^{++} al citosol, siguiendo sus respectivos **gradientes de concentración**. En el año 2001 se caracterizó un tipo de canal iónico, sensible al pH, denominado CatSper (Ren et al., 2001), el cual justificaría cómo la activación de este canal de Ca^{++} requiere alcalinización extracelular, y se plantea que la **despolarización** de la membrana, inducida por la elevación del K^+ **extracelular**, es la causa del incremento en la **permeabilidad** de la **membrana plasmática** a los H^+ . Es por esto que el elevado **pH extracelular** ayuda a alcanzar la alcalinización intracelular necesaria para la activación del canal CatSper1 (Lishko et al., 2010).

En la **Figura 20** se presenta un modelo integrado de la activación-regulación de los **canales** del espermatozoide de hámster. Se puede apreciar que los iones HCO_3^- entran y activan una adenilato ciclasa soluble (sAC), que a su vez aumenta la síntesis de AMPc. El AMPc activa (directa o indirectamente) al intercambio específico Na^+/H^+ espermático (sNHE ó NHX), lo que a su vez incrementa el pH intracelular. La alcalinización intracelular estimula poderosamente a CatSper y KSper. La potenciación mediada por alcalinización del KSper hiperpolariza el potencial de membrana de 0 a - 50 mV. La entrada de Ca^{++} a través del CatSper induce un aumento en $[Ca^{++}]_i$, activando la calmodulina (CaCaM) y la calmodulina Kinasa. Estos cambios aumentan la curvatura flagelar y amplifica la producción de ATP, y así se incrementa la resistencia espermática y la motilidad HA (Navarro y col., 2008).

Los **canales iónicos** permiten el **flujo pasivo** de los **iones** a favor de su **gradiente de concentración** química, pero al estar cargados eléctricamente también deben hacerlo a favor de su **gradiente eléctrico**. En general, se clasifican en función del ión para el que muestran **permeabilidad selectiva** en función de elementos que provocan la **apertura** del **canal** (Ferrer Villada, 2004). La forma en la que los canales de K^+ se abren para permitir que los iones K^+ atraviesen la **membrana celular**, es un proceso crucial en muchos **procesos biológicos**. Aquí radica la importancia del presente estudio ya que, si se consigue **modular** o **modificar** estos, se podrían diseñar nuevas drogas para tratar patologías relacionadas con la reproducción, así como el desarrollo de contraceptivos.

Existen diferentes fármacos con la capacidad de bloquear los canales de K^+ (Figura 21), cabe destacar que a pesar de poseer estructuras químicas diferentes, todos presentan anillos aromáticos.

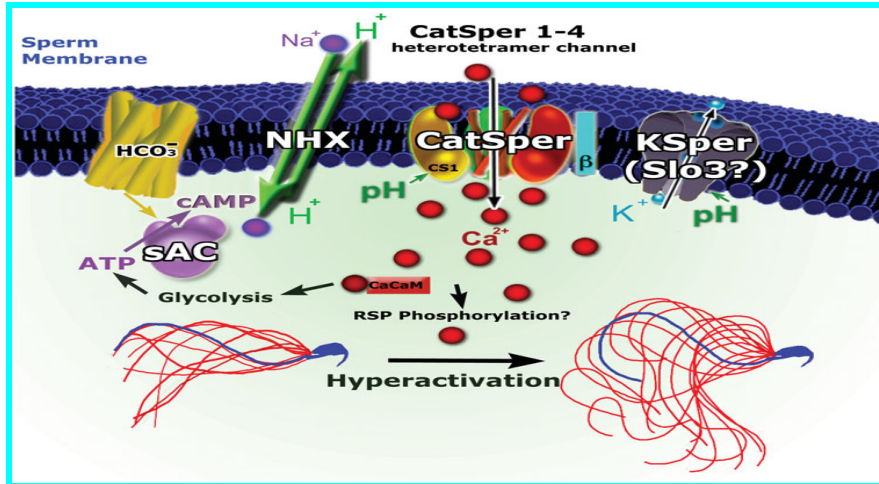


Figura 20: Modelo integrado propuesto para la activación y regulación de los canales iónicos del espermatozoide. sAC: adenilato ciclasa soluble; NHX: intercambiador específico Na^+/H^+ espermático; CaCaM: calmodulina; RSP: proteína radical de mensaje (tomado de Navarro y col., 2008).

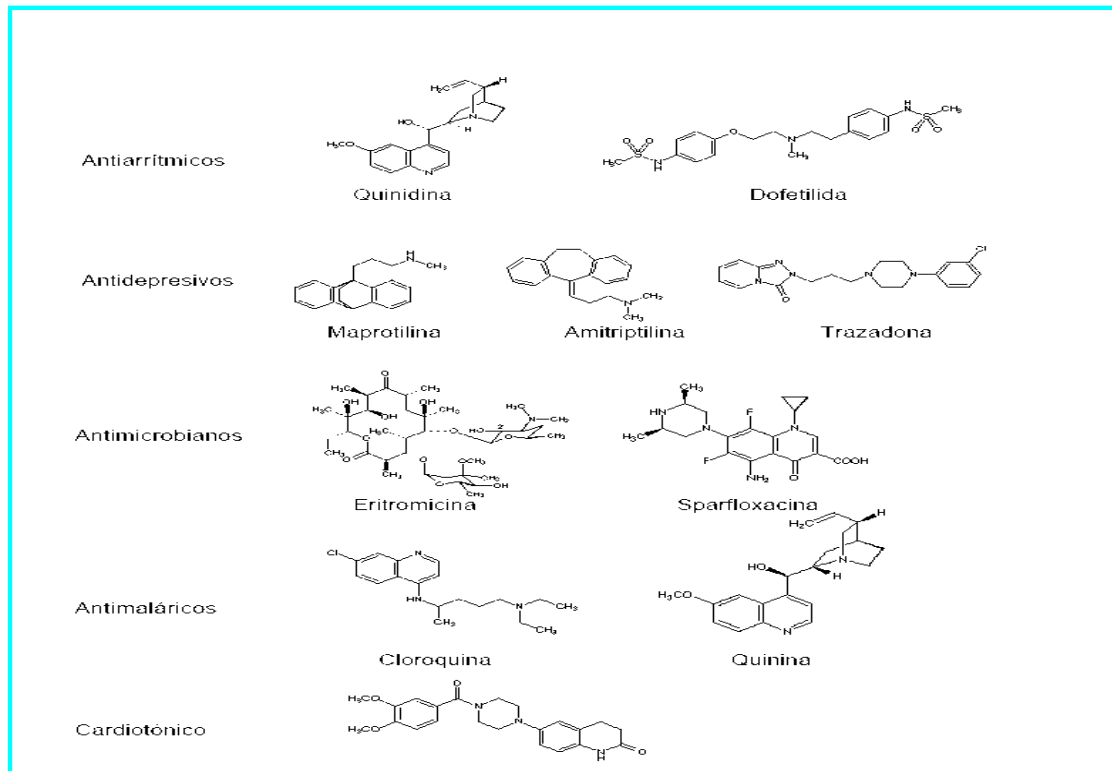


Figura 21: Diferentes grupos de fármacos que bloquean canales de K^+ . Se puede notar la diferencia entre las estructuras químicas de cada uno de ellos, aunque todos poseen anillos aromáticos (tomado de Ferrer Villada, 2004).

En este trabajo se utilizó **Quinina** en su forma hidrosoluble ya que se ha determinado que el **espermatozoide humano** posee **canales de K⁺** sensibles a este fármaco (Yeung y Cooper, 2001).

B.- OBJETIVOS:

B.1- OBJETIVO GENERAL

Estudiar, mediante un modelo *in vitro*, si existe asociación entre la osmolalidad del medio y la adquisición de capacidad fecundante del espermatozoide humano.

B.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la osmolalidad de los distintos ambientes por donde transita el espermatozoide humano en su paso hacia el ovocito (plasma seminal, fluido vaginal, moco cervical, fluido folicular, fluido peritoneal y fluido oviductal).
- 2) Evaluar el efecto de la variación en la osmolalidad sobre la funcionalidad espermática.
- 3) Determinar la participación de canales de K^+ sensibles a quinina durante la regulación del equilibrio osmótico en espermatozoides humanos.
- 4) Evaluar el efecto que ejerce la osmolalidad elevada durante la criopreservación de espermatozoides humanos.

C.- METODOLOGÍA

C.1- Consideraciones éticas

Este proyecto fue evaluado y aprobado por los Comites de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y de la Facultad de Ciencias Médicas, ambas de la Universidad Nacional de Rosario.

C.2.- Criterio de inclusión

Para descartar posibles alteraciones en la función espermática se utilizaron únicamente donantes masculinos normozoospermicos (todos los parámetros dentro de la normalidad establecida, OMS, 1999).

El moco cervical (MC) y el fluido vaginal se obtuvieron durante la prueba post-coital de Sims Hühner en pacientes que realizaron estudios por infertilidad en el Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario. Las pacientes se encontraban en fecha ovulatoria (calculada en ciclo menstrual previo) y se les solicitó tener relaciones sexuales la noche previa. Las características del MC se evaluaron según lo descrito en el manual OMS (OMS, 1999), y sólo se utilizaron aquellos que presentaban un score > 10, lo que indicaba un moco cervical periovulatorio.

El fluido folicular (FF) se recolectó de pacientes estimuladas hormonalmente que participaron de un programa de Fertilización *in vitro*. Se utilizaron solamente los líquidos obtenidos de ovocitos maduros (metafase II).

El fluido peritoneal (FP) se obtuvo de pacientes sin patología tubo-peritoneal, ni endometriosis, libre de contaminación con sangre y dentro del período peri-ovulatorio. Los fluidos fueron obtenidos por el cirujano durante la cirugía laparoscópica, la cual se realizó como parte del protocolo de estudio de parejas con trastorno reproductivo, en fecha periovulatoria calculada a partir de ciclos previos de las pacientes que consultaron el Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario.

El fluido oviductal (FO) se obtuvo mediante pasaje de medio de cultivo, una vez en el laboratorio, a través de los oviductos obtenidos de pacientes que se sometieron a histerectomía por causa benigna en el Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario.

En todos los casos donantes y pacientes recibieron un consentimiento informado por escrito.

C. 3.- Recolección y almacenamiento de fluidos

La muestra de moco cervical fue obtenida por el ginecólogo con jeringa de tuberculina de 1 ml. Una vez aspirado el moco cervical y el fluido vaginal, se procedió a su licuación por pasajes sucesivos a través de la jeringa. Se refrigeraron las muestras a 4°C hasta el momento de la determinación de la osmolalidad.

El fluido peritoneal (FP) fué aspirado del fondo de Saco de Douglas en pacientes que realizaron una laparoscopia diagnóstica en fecha periovulatoria (16.6 ± 0.5 día, y la edad media de las pacientes fue de 25.3 ± 1.8 años). El FP se colocó en un tubo estéril y remitió al Laboratorio a la brevedad. En el caso de que el FP estuviera contaminado con sangre se descartó.

El fluido folicular (FF) se recolectó de pacientes estimuladas hormonalmente que participaron de un programa de Fertilización *in vitro*. Las pacientes, fueron estimuladas diariamente con 150 UI de gonadotrofina menopáusica humana (hMG, Laboratorio Serono, Argentina) desde el día 3 del ciclo. Ante la observación ecográfica de folículos > 18 mm, se procedió a la aplicación de 10.000 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Laboratorios Serono, Argentina). Los ovocitos fueron obtenidos mediante punción ecográfica transvaginal, 36 h luego de la hCG. Los FFs provenientes de folículos que contenían ovocitos maduros (metafase II) se juntaron y utilizaron en forma de pool ($n = 6$).

El fluido oviductal (FO) se obtuvo de oviductos de pacientes premenopáusicas sin patología tubaria, las cuales fueron sometidas a histerectomía por causas no oncológicas. Para obtener el FO se pasó un volumen fijo de medio Ham's F-10 con jeringa de tuberculina y se colectó el fluido resultante.

Las muestras de FP, FF y FO fueron centrifugadas 10 min a 600g para remover restos celulares y el sobrenadante se filtró (0.22 μ m de poro, Millipore), se dividió en alícuotas de 200 μ l y se guardó en freezer a -20°C.

La recolección del plasma seminal (PS) se efectuó con las muestras de semen recién licuefaccionadas. Para la obtención de los PS, las muestras se procesaron dentro de la hora de eyaculadas y fueron mantenidas a 37°C. Se colocaron 500 μ l del semen en un tubo eppendorff y se centrifugó 10 min a 800g para remover restos celulares, luego se dividió en alícuotas de 60 y 200 μ l y se almacenaron a -20°C.

C.4- Determinación de osmolalidades de MC, fluido vaginal y PS, FO, FF y FP

El día de los ensayos se descongelaron alícuotas (50 µl por duplicado) de cada una de las muestras de PS, FO, FF y FP, se colocaron en eppendorf para lectura en el osmómetro y se evaluaron las osmolalidades de todos ellos. En el caso del MC y fluido vaginal se utilizaron las muestras recién obtenidas, procediendo de igual modo para la lectura, mediante osmómetro de punto de congelamiento (Osmomat 030; Gonotec GMBH, Berlín). El osmómetro fue previamente calibrado, utilizando para el "0" H₂O destilada de buena calidad y para el "300 mOsm/kg" solución de calibración (para Osmomat 030; Gonotec GMBH, Berlín FRG).

C.5- Evaluación de la osmolalidad de los distintos medios utilizados

El día de los ensayos se tomaron alícuotas (50 µl por duplicado) de cada uno de los medios utilizados habitualmente en el manejo *in vitro* de los espermatozoides humanos: Ham's F10, los medios con las osmolalidades corregidas (M340 y M400), Percoll 90%, Medios Crioprotectores, así como una alícuota de la mezcla Semen/Medio Crioprotector. Se evaluaron todas las osmolalidades, mediante osmómetro de punto de congelamiento (Osmomat 030; Gonotec GMBH, Berlín), según se describió previamente.

C.6- Variación de la osmolalidad con el tiempo post eyaculación

Con la finalidad de determinar si existía una variación de la osmolalidad durante el tiempo posterior a las eyaculación, se determinó la osmolalidad de 28 plasmas seminales a distintos tiempos, luego de obtenida la muestra de semen. Las alícuotas del PS se recuperaron luego de mantener a 37°C la muestra de semen durante 10, 20, 30 y 60 min. Inmediatamente de recogidas las alícuotas se centrifugaron 10 min a 800g para remover restos celulares, luego se dividieron en fracciones de 60 µl y se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis. El protocolo para determinar la osmolalidad se describió previamente.

C.7- Procesamiento inicial del semen

Las muestras de semen fueron obtenidas de donantes, previa lectura y firma del consentimiento informado, luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual, por masturbación en un recolector estéril. Luego de la licuefacción, 30 a 60 min a 37°C, se clasificaron según los criterios estipulados por la OMS (OMS, 1999). Se evaluó la

concentración espermática mediante recuento en cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), analizando 10 campos por triplicado, el movimiento subjetivo según clasificación estipulada por OMS. Se analizó el porcentaje de formas morfológicamente normales según los criterios estrictos luego de tinción con Hematoxilina al 30% (Kruger y col., 1986, 1988). Además se evaluó el índice de anomalías múltiples (IAM) de acuerdo con la siguiente fórmula:

Normales

- a) Anormales
- b) Anomalías de Cabeza
- c) Anomalías de Pieza media
- d) Anomalías de Cola
- e) Exceso de resto citoplasmático.

$$\text{IAM} = \frac{\text{cantidad de anomalías totales}}{\text{esp. Anómalos totales}} = \frac{\text{b} + \text{c} + \text{d} + \text{e}}{\text{a}}$$

Un valor de IAM superior a 1,6 se asocia con menores posibilidades de fecundación *in vitro*.

C.8- Motilidad subjetiva

La motilidad luego de los distintos tratamientos fue analizada subjetivamente depositando 10 µl de la muestra en una cámara de Makler y clasificando los espermatozoides según su movimiento en grados de acuerdo con lo estipulado en el manual de la OMS (OMS, 1999), siendo: inmóviles: G0, móviles in-situ: GI, móviles progresivos: GII y móviles progresivos rápidos: GIII.

C.9- Viabilidad

Una alícuota de 10 µl de la muestra a analizar se mezcló 1:1 con una solución de Eosina-Y al 0.5% en buffer fosfato (PBS; GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) luego de unos minutos se evaluó una gota en microscopio óptico, contabilizando 100 espermatozoides y discriminando vivos (no teñidos) de muertos (teñidos); se informó como % de espermatozoides vivos (Eliasson, 1977). Esto se aplicó en todos los casos donde fue necesario determinar la viabilidad de los espermatozoides, como control del tratamiento.

C.10- Recuperación por Swim-up

Con la finalidad de obtener los espermatozoides móviles de las muestras de semen se seleccionaron mediante la técnica de Swim-up (Swup). Brevemente, 1 ml de semen se colocó en el fondo de un tubo cónico y se agregó por encima 1 ml de medio Ham F-10 (HyClone, Utah, USA). Luego de dejar al tubo inclinado a 45° con la horizontal por 60 min, se recuperó con cuidado la capa sobrenadante donde se encontraban los espermatozoides móviles libres de PS. Esta técnica fue utilizada para seleccionar espermatozoides en todos los diseños experimentales a lo largo de las distintas etapas de este estudio.

C.11- Incubaciones a diferentes osmolalidades

Para determinar el efecto de las diferentes osmolalidades estudiadas, se trabajó en todos los casos con medio Ham's F-10 al que se le modificó la osmolalidad mediante el agregado de sacarosa (azúcar que no participa del metabolismo espermático) (D(+)-Sucrosa, Fluka, BioChemica, Suiza) de forma sólida para evitar diluciones. El rango fisiológico de osmolalidades utilizadas fué de 280, 340 y 400 mOsm/kg (M280, M340 y M400 respectivamente, considerando al medio M280 como control, ya que es la osmolalidad del medio de uso habitual en las técnicas de reproducción asistida). Este rango de osmolalidades remedó los distintos ambientes del tracto reproductivo femenino y el plasma seminal (Caille, 1996). En esta primera etapa se siguió el **diseño experimental 1**. Una vez recuperada la población de espermatozoides móviles por la técnica de Swup se resuspendieron los espermatozoides en los medios definidos (M280, M340 y M400) suplementados con BSA 35 mg/ml (fracción V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y fueron capacitados, según se detalla a continuación, durante 6 y 20 h. En todos los casos se determinaron según las metodologías descriptas: viabilidad, movimiento, morfología y habilidad fecundante (mediante patrón de fosforilación de proteínas en residuos tirosina y reacción acrosomal).

C.12- Incubación bajo condiciones capacitantes

Luego de la separación y lavado de las muestras de semen, el pellet obtenido con los espermatozoides móviles se resuspendió en medio Ham F-10 a las diferentes osmolalidades, suplementado BSA 35 mg/ml, a una concentración de $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml, y se incubaron 6 y 20 h a 37°C y 5% CO₂ (Tesarik, 1996). Esta

metodología se siguió en todos los casos donde fue preciso capacitar a los espermatozoides.

C.13- Evaluación de la habilidad fecundante

Existen diferentes estimadores de la habilidad fecundante, junto a la motilidad y la viabilidad, entre los cuales se encuentran la reacción acrosomal (RA) inducida por diferentes inductores fisiológicos o no (como son entre otros FF, progesterona, zona pelúcida solubilizada o ionóforo de Ca^{++}), los patrones de fosforilación de proteínas en residuos tirosina, la unión a hemizona de ovocitos homólogos metafase II, la penetración de ovocitos desnudos de hamster, entre otras. Algunas de estas técnicas han dejado de ser de uso común por lo engorrosas o por la poca disponibilidad del material o células necesarias. En el presente estudio se eligieron para la evaluación de la habilidad fecundante la RA inducida con FF y los patrones de fosforilación de proteínas en residuos tirosina.

C.13.1- Fosforilación en tirosina

El patrón de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina está considerado un buen estimador de capacitación (requisito previo indispensable para la fecundación) que involucra la activación de sistemas quinasa de proteínas que resultan fosforiladas en sus residuos tirosina.

Según se describió en el diseño experimental las muestras fueron incubadas por 6 y 20 h, en condiciones capacitantes. El proceso de capacitación es por definición reversible. En el PS se encuentran presentes factores decapitantes por lo cual el agregado de PS genera la reversión del proceso y es por esto que se utiliza al PS como un control de reversibilidad de la capacitación (Tomes y col., 1998). Para ello se agregó el control de decapitación (Swup + PS), lo que corresponde a los espermatozoides capacitados en M280 (6 o 20 h) y luego expuestos por 20 min a PS (20% v/v). Todas las muestras, controles (muestras Post Swup y decapitados Swup + PS) y los espermatozoides capacitados 6 y 20 h a 37°C y 5% de CO_2 en los distintos medios (M280, M340 y M400), fueron lavados dos veces en PBS y resuspendidos en buffer Laemmli (0.025 M Tris, 0.5% SDS, 5% glicerol, pH 6.8) (Laemmli, 1970) conteniendo 5 mg/ml DNAsa. Luego de 15 min a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 6000g por 5 min. Luego de recuperar el sobrenadante, se calienta a 100°C en presencia de 70 mM 2-β-mercaptoetanol por

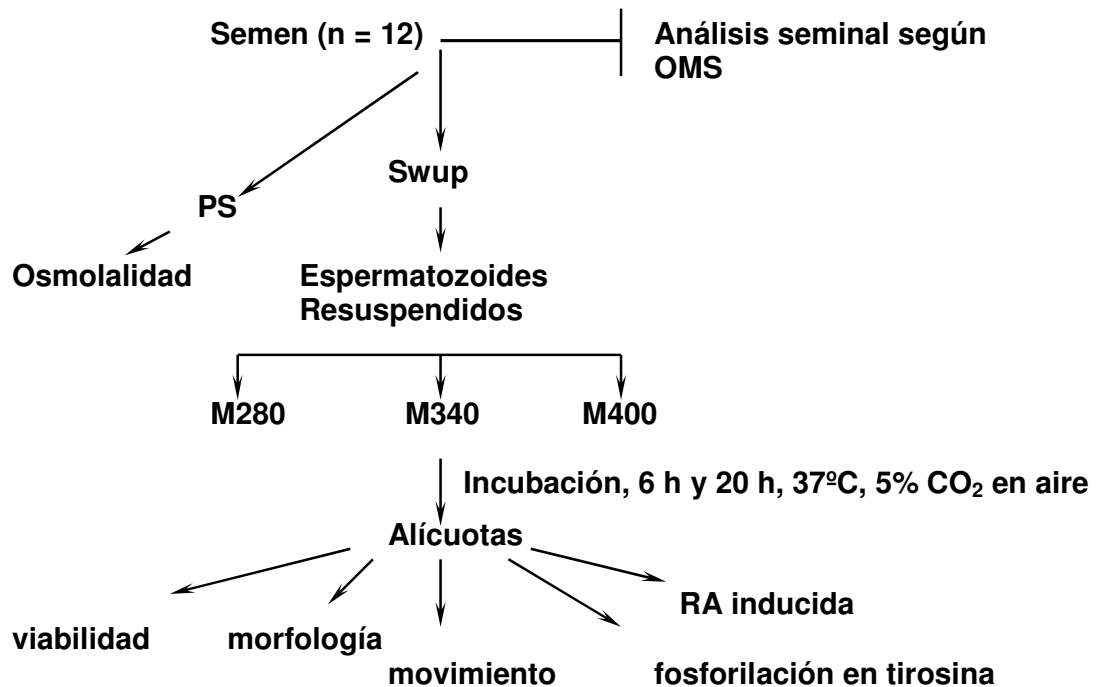
5 min para romper los puentes disulfuro entre proteínas y obtener las cadenas polipeptídicas. El sobrenadante fué centrifugado 2 min a 10.000g y congelado a -20°C hasta su utilización. Las proteínas solubilizadas correspondientes a 2×10^6 espermatozoides en 30 μ l, fueron sembradas en un gel al 7% de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970), utilizando paralelamente estandares de peso molecular (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). La transferencia electroforética de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin y col. (1979), a 35 V y 4°C por 18 h. Para bloquear la unión a sitios no específicos, la membrana fué pre-tratada con 2% leche en polvo descremada en PBS, y 0.1% Tween 20 (solución de bloqueo). La nitrocelulosa fué luego incubada 1 h con el anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (cat # 05-321, Upstate Biotechnology Inc., NY, USA) diluído 1:10000 en solución de bloqueo. Luego de 4 lavados con PBS - 0.1% Tween 20, se agregó como segundo anticuerpo IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (cat #115-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) diluída 1:5000 en solución de bloqueo, durante 1 h, con agitación. La membrana fué lavada, y la quimioluminiscencia de las bandas detectada en una placa radiográfica utilizando el kit ECL (Amersham Life Science Inc., Oakville, ON, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. En algunos experimentos el anticuerpo antifosfotirosina fué bloqueado con 40 mM o-fosfotirosina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 1 h con agitación constate previo a su empleo, como control de especificidad. Se evaluaron las placas autorradiografiadas para estudiar los patrones de fosforilación, en todos los casos.

C.13.2- Reacción acrosomal espontánea e inducida

Para la evaluación de la RA se trabajó con cada suspensión de espermatozoides, incubados 6 y 20 h a 37°C y 5% de CO₂, dividiéndolas en dos alícuotas. En una de las alícuotas se evaluó la RA basal o espontánea como control, y a la otra se le agregó FF (20% v/v) manteniéndola por 30 min a 37°C bajo atmósfera de 5% CO₂ para evaluar la RA inducida (Cross y col., 1986; Mendoza y col. 1992). Los espermatozoides de ambas alícuotas se lavaron dos veces con PBS, para remover el medio de cultivo. Se ajustaron los volúmenes de modo que no resulten mayores de 100 μ l y estas suspensiones de espermatozoides se esparcieron sobre

portaobjetos correctamente identificados, dejándolos secar al aire. Los preparados fueron fijados por exposición a metanol frío 30 s y se expusieron a la lectina *Pisum sativum* (50 µg/ml en PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de repetir varios lavados con PBS se montaron con glicerol al 90% en PBS. Se evaluaron 100 espermatozoides por duplicado, en microscopio de fluorescencia a 1000x, considerándose reaccionados aquellos espermatozoides que presentaron fluorescencia en la región ecuatorial (SE) o acrosoma punteado (Parche). Los espermatozoides donde el acrosoma se presentó plenamente fluorescente se consideraron como no reaccionados o intactos. Se expresaron los resultados como % de espermatozoides reaccionados en los distintos patrones o totales (%SE, %Parche, %RT, respectivamente). Se denominó score o población inducible a la diferencia entre el porcentaje de RA inducida menos el porcentaje de RA basal o espontánea (sin inductor) ($PI = I - B$).

C.13.3- Diseño experimental 1



C.14- Bloqueo selectivo del canal de K⁺

Se ha determinado que la Quinina bloquea canales de K⁺ en el espermatozoide humano (Yeung y Cooper, 2001; Yeung y col., 2003), es por esto es que fué utilizada en este estudio para determinar la función de los canales de este

ión. Se utilizó el sulfato Quinina (Rhone-Poulenc, Paris; Q), o sea en su forma hidrosoluble, ya que los espermatozoides están suspendidos en medios acuosos.

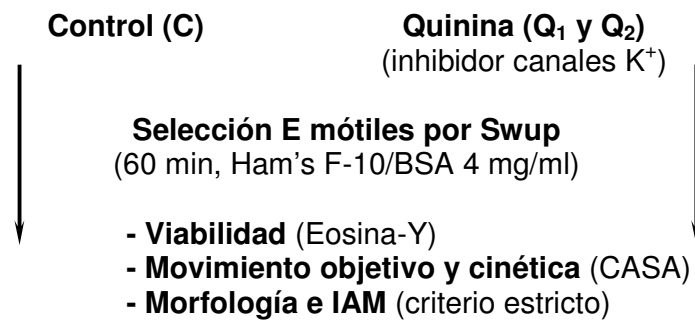
C.14.1- Determinación de la concentración adecuada de Quinina

En la literatura se han encontrado concentraciones de Quinina variables que actúan inhibiendo los canales sensibles y por ello se determinó, para los protocolos de trabajo de este estudio, la concentración adecuada, tal que no resulte tóxica para los espermatozoides humanos. Se realizaron experimentos previos para determinar cuál era la concentración de Quinina que no resultaran tóxica para el espermatozoide realizando un Swim up en presencia de Q₁: 62,5 µM o Q₂: 125 µM o medio control (n = 8, **diseño experimental 2**). Se determinó la concentración de Q, a partir de la cual se observaba una disminución significativa en la viabilidad y en el % de espermatozoides móviles respecto a los controles. Teniendo en cuenta esto, la concentración adecuada (Q₁) se utilizó en los estudios posteriores.

C.14.2- Diseño Experimental 2

Muestras de semen (n = 8)

- Índice de Anomalías Múltiples (IAM)



C.14.3- Acción de la Quinina

Para evaluar la acción de la Quinina en la función espermática se utilizaron 21 muestras de semen. Los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante la técnica de Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml: C), en ausencia (control) o presencia del inhibidor de canales de K⁺ (C y Q respectivamente). Se evaluó viabilidad (Eosina-Y), movimiento objetivo y cinética (CASA), morfología y el índice de anomalías múltiples (IAM), así como la capacitación y RA inducida. Para evaluar la

reversibilidad de la acción de la Q, una alícuota de espermatozoides tratados con Q se centrifugaron (600g, 5 min) y se resuspendieron los mismos en medio control, luego de lo cual se analizaron los parámetros del movimiento objetivo y cinética, la morfología y el IAM, capacitación y RA inducida (**diseño experimental 3**).

Mediante el **diseño experimental 3** se evaluó la inhibición de canales de K⁺ (utilizados por el espermatozoide en la regulación de su volumen ante un stress osmótico).

C.14.4- Análisis computarizado de movimiento espermático (CASA)

El análisis computarizado del movimiento espermático se analizó depositando 10 µl de semen en una cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel). La imagen capturada por el microscopio de contraste de fase a 20x fue transferida a una video cámara (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) y analizada por el sistema de captura ME II (RoyCo S.A., Madrid, España).

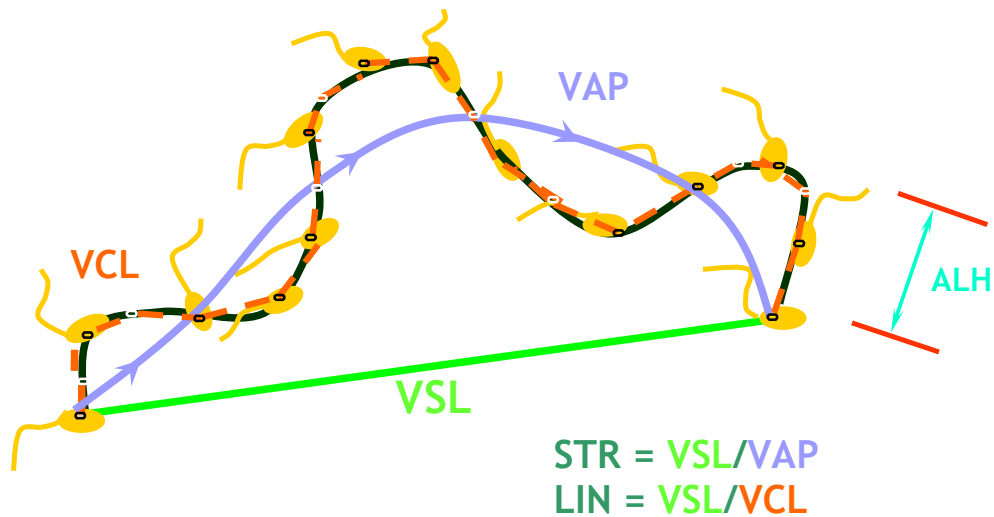


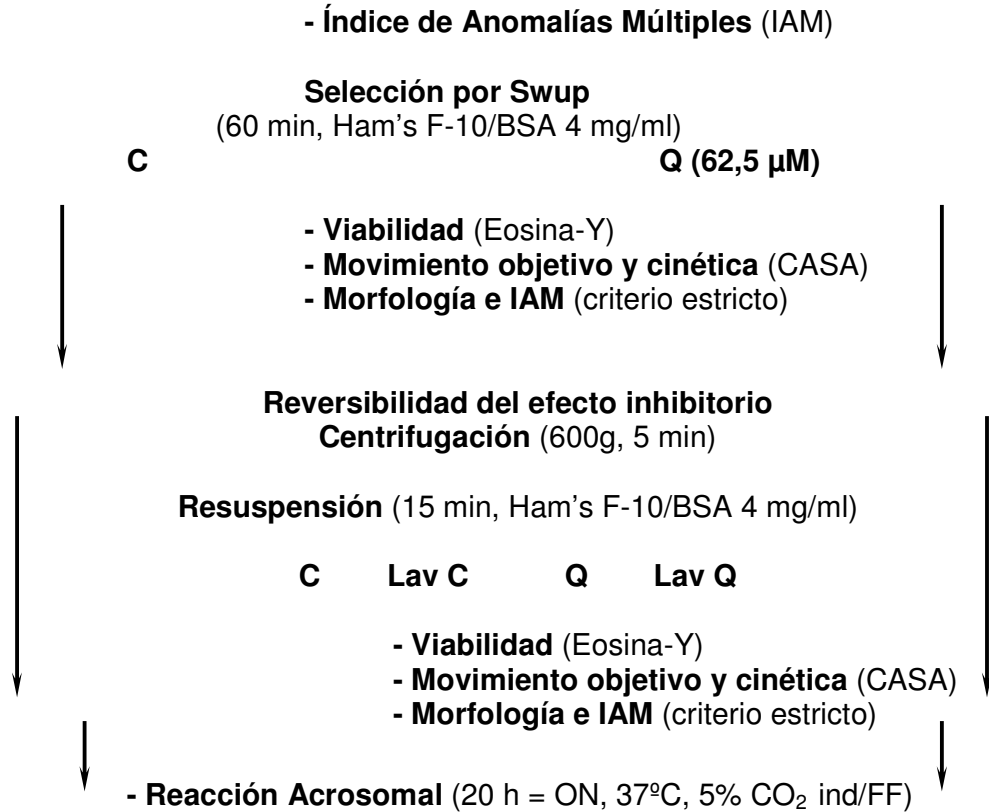
Figura a: Parámetros cinéticos del movimiento. Según, VAP: velocidad de camino medio (µm/s), VCL: velocidad curvilínea (µm/s), VSL: media de velocidad rectilínea (µm/s), LIN: linealidad y ALH: desplazamiento lateral de la cabeza (µm), STR: progresividad.

Los parámetros cinéticos registrados fueron: concentración espermática, % motilidad, % células rápidas (VAP > 25 µm/s), % de células progresivas (VAP > 5 µm/s), velocidad de camino medio (VAP, µm/s), media de velocidad curvilínea (VCL, µm/s), media de velocidad rectilínea (VSL, µm/s), media de linealidad (LIN),

progresividad (STR) y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm), como se presentan en la **Figura a**.

C.14.5- Diseño Experimental 3

Muestras de semen (n = 21)



C.15- Criopreservación

Los medios crioprotectores utilizados en las técnicas de criopreservación presentan osmolalidades muy elevadas. Es por esta razón que se decidió estudiar la función espermática en muestras criopreservadas, evaluando la acción de resuspender las muestras lavadas en un medio de osmolalidad mas elevada que el habitual de trabajo (280 y 400 mOsm/kg). También se evaluó la función de los canales de K⁺ sensibles a Quinina mediante la inhibición de los mismos.

C.15.1- Protocolo de la Criopreservación

Comercialmente se utilizan medios formulados específicamente para la criopreservación de espermatozoides de distintas especies. Entre ellos, el medio utilizado en los procedimientos de criopreservación de espermatozoides humanos fue

el Freezing Medium-TYB con Glycerol y Gentamicin (Irvine Scientific, Santa Ana California). La formulación de este medio crioprotector es 12% v/v Glycerol, 20% yema de huevo -de USDA certificado SPF (libre de virus) en agregados laminados, inactivado por calor a 56°C por 30 min, 10 µg/ml Sulfato de Gentamicina.

Una vez descongelado el crioprotector a 37°C, se agrega al semen lentamente, gota a gota con agitación constante (1:1). Esta mezcla es mantenida 10 min a temperatura ambiente. Luego se llenan los criotubos hasta un 90%. Se debe limpiar el exterior con alcohol al 70% u otro antibacteriano. Luego se incuban 8 min a -20°C. Finalmente se ubican correctamente identificados en cestillas en N₂ líquido (-196°C).

C.15.2- Descongelado

Para conseguir descongelar las muestras adecuadamente se deben colocar los crioviales en un papel tissue o en una gradilla. Se deben mantener 5 min a temperatura ambiente, desinfectar el exterior y luego se colocan 10-20 min a 37°C.

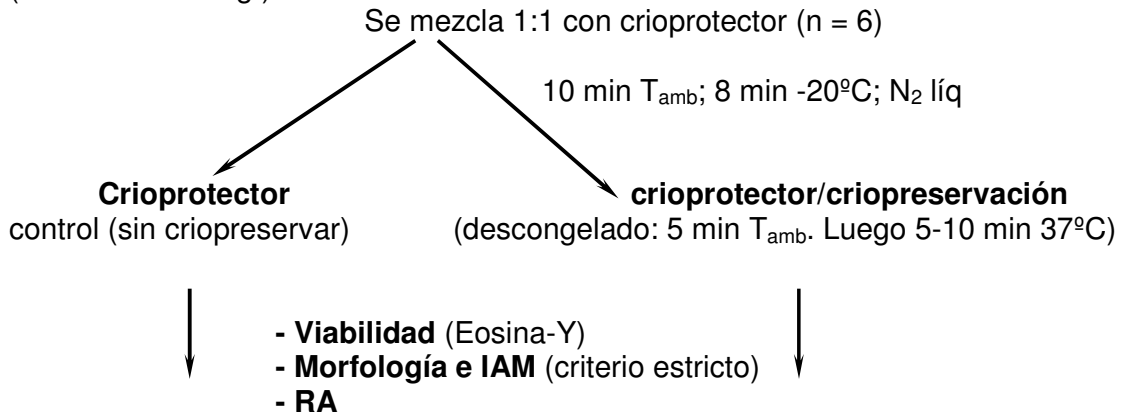
C.15.3- Acción del crioprotector y de la criopreservación

Durante el procedimiento de criopreservación de los espermatozoides, las células pueden sufrir una doble injuria. La primera al ser mezcladas con el medio crioprotector que presenta una hiperosmolalidad, y luego por el efecto de las bajas temperaturas al ser conservadas/descongelada. Cabe también destacar que una vez descongeladas, se lava el medio hiperosmolal y durante este procedimiento podría sufrir un shock hipoosmótico ya que los medios de lavado presentan una osmolalidad de 280 mOsm/kg.

Con el fin de evaluar la acción del crioprotector separadamente de la criopreservación se realizaron ensayos previos mediante protocolo de uso habitual, según **diseño experimental 4**. Para esto se mezclaron las muestras de semen con el crioprotector, se dividió la mezcla en dos alícuotas, una fue criopreservada (almacenada a -196°C) y la otra no (control, no se introdujo en el N₂). El control fue evaluado inmediatamente de estabilizada la mezcla (10 min) y la criopreservada fue descongelada según protocolo habitual evaluándose los mismos parámetros que para el control. Se evaluaron en ambos casos viabilidad, morfología e IAM y RA.

C.15.4- Diseño Experimental 4

Muestra de semen se evalúa la muestra original, osmolalidad de PS y medios (osmóm. Pto cong.)

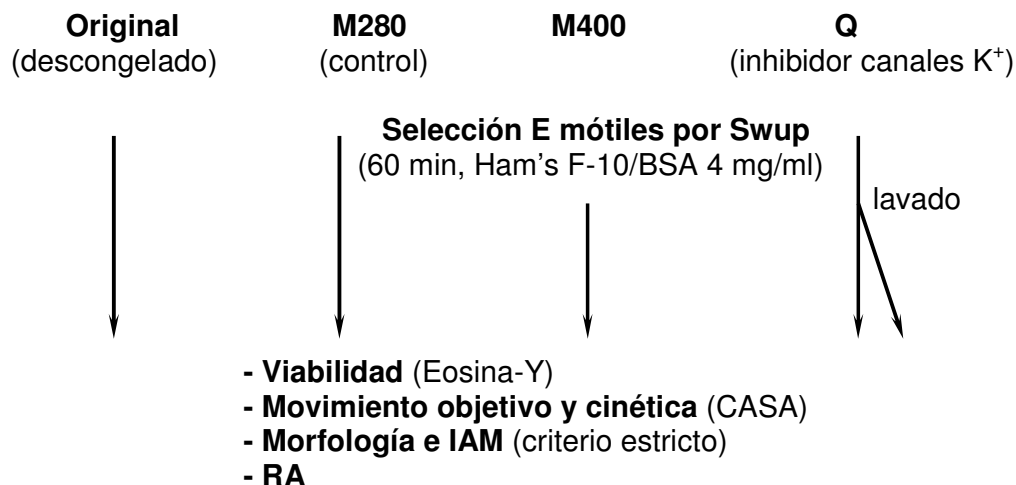


C.15.5- Exposición a medios hiperosmolales, aplicación clínica

Con el fin de evaluar la acción de la exposición a medios hiperosmolales sobre la recuperación de la función espermática, se realizaron estudios en 20 muestras criopreservadas mediante protocolo de uso habitual (detallados en 14.1- y 14.2-). Se evaluaron las muestras recién descongeladas (original), las lavadas y recuperadas en medio de uso habitual (M280) y en medio de osmolalidad intermedia (M400). Una vez que las muestras son sacadas del N_2 líquido y se llevan a temperatura de trabajo (37°C), los espermatozoides se encuentran en contacto con un medio hiperosmolal. Los espermatozoides han debido equilibrarse con este medio y al ser recuperados en el medio habitual de trabajo (M280) es posible que el shock hipoosmótico genere una injuria. Con la intención de evaluar el efecto de este manejo se propuso recuperar los espermatozoides en un medio de osmolalidad intermedia (M400) para evaluar si era posible mejorar la recuperación. Además se inhibieron los canales de potasio con quinina para determinar si en la regulación del volumen participaban los mismos. El efecto de inhibidores de canales iónicos (Q), se evaluó utilizando el **diseño experimental 5**. En todas las muestras se evaluaron la viabilidad, el movimiento objetivo y la cinética, la morfología e IAM y la RA.

C.15.6- Diseño Experimental 5

Muestras de semen criopreservados (n = 20)



C.16- Estudio de la aplicación Clínica

Considerando que muchos de los pacientes oncológicos actualmente son jóvenes y tienen tasas de supervivencia mayores, la necesidad de preservar la fertilidad futura resulta una problemática habitual.

La criopreservación es utilizada, en nuestro medio, para preservar muestras de pacientes oncológicos que serán tratados mediante quimio y/o radioterapia.

C.16.1- Datos procedimiento y calidad seminal según tiempo post tratamiento oncológico

Los pacientes oncológicos que fueron estudiados, presentaron una edad media de $26,8 \pm 0,7$ años. La patología más frecuente para la implementación de los distintos tratamientos oncológicos fueron: tumor testicular (52%), seguido del Linfoma (27%) y otros tumores 21%. El 64% de los casos recibieron quimioterapia, el 23% radioterapia, mientras el 13% restante recibió un tratamiento combinado de quimio y radioterapia.

Todos los pacientes preservaron sus muestras en el Laboratorio Reprolab del Sanatorio Británico de Rosario y fueron monitorizados durante 12 y 24-36 meses. El único requisito solicitado a los pacientes fue tomar las muestras de semen en un colector estéril con 3 a 5 días de abstinencia sexual, cuando fue posible por las necesidades de tratamiento.

Los pacientes fueron convocados, una vez finalizados sus tratamientos, a los 12 meses de haber congelado su semen, para evaluar su calidad seminal (n = 25). En algunos casos concurren a una segunda evaluación en un período de 24 a 36 meses post tratamiento. Se les evaluaron los parámetros seminales volumen, concentración, motilidad objetiva (CASA).

C.17- Análisis estadístico de los datos

Los datos se analizaron usando un Software provisto por CDC-OMS (Epi. INFO) y un Sistema de tipo SAS. Para el análisis de los datos no paramétricos se utilizaron los test de Kruskal-Wallis y Mann Whitney. Se utilizó el test de Duncan para analizar diferencias entre los tratamientos.

Para analizar los datos paramétricos se empleó el análisis de la varianza mediante un ANOVA. Para determinar diferencias entre tratamientos se usó el test de Dunnett. Los datos se expresan en su mayoría como media \pm ES, considerando significativo un valor de $p < 0.05$.

D.- RESULTADOS

D.1- Osmolalidad de los fluidos en los distintos espacios biológicos

El primer punto a evaluar en este estudio fue la osmolalidad de los diferentes espacios por los que transita el espermatozoide durante su ascenso hacia el lugar de la fecundación. En la **Tabla 1**, se aprecia la osmolalidad de los diferentes fluidos analizados, las mediciones repetidas de un mismo fluido reportaron un valor que no varió en mas de un 1% entre replicados.

Tabla 1: Osmolalidad de los fluidos de los tractos reproductivos femenino y masculino. Siendo PS: plasma seminal; FF: fluido folicular; FP: fluido peritoneal (mOsm/kg).

Fluido	Media \pm ES	Rango
PS (n = 20)	358 \pm 09	256 - 537
Vaginal (n = 3)	313 \pm 27	286 - 340
Moco Cervical (n = 7)	361 \pm 38	240 - 528
Tubario (lavado) (n = 3)	269 \pm 14	253 - 297
FF (n = 9)	287 \pm 09	219 - 357
FP (n = 4)	232 \pm 14	259 - 269

Los resultados obtenidos, sugieren que los espermatozoides inmersos en el PS encuentran un fluido con una osmolalidad de 358 \pm 9 mOsm/kg y que a partir de la deposición en la vagina comenzarían a ascender a través de ambientes de osmolalidad descendente en sentido PS-ampula. El sitio donde se concretará la fecundación contiene un fluido que resulta de una mezcla de diferentes orígenes: FO (secreción de las células epiteliales que lo recubren, transudado y aporte desde el

útero), FF (que acompaña al complejo cúmulo-ovocito) y FP ya que el oviducto es un órgano abierto hacia la cavidad el peritoneal.

D.2- Osmolalidad del PS según el tiempo post eyaculado

El plasma seminal esta compuesto por variadas moléculas entre las cuales se encuentran las enzimas que participan en el proceso coagulación-licuefacción. Estas enzimas de carácter hidrolítico y proteolítico pueden actuar sobre las macromoléculas presentes generando más moléculas osmóticamente activas, esto podría generar un cambio en la osmolalidad, que aumentaría a medida que se generan las escinciones. Para el análisis del semen se recomienda evaluarlo una vez licuefaccionado como máximo a la hora de obtenido. Con la finalidad de evaluar si la osmolalidad del PS varía con el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su procesamiento, se evaluó la osmolalidad a diferentes tiempos post eyaculación (10, 20, 30 y 60 min). Se pudo comprobar que la osmolalidad del PS aumenta con el tiempo post eyaculación, y resulta significativo a partir de los 20 min (**Figura 22**; n = 28, donde ** indica $p < 0.001$ respecto a 10 y 20 min).

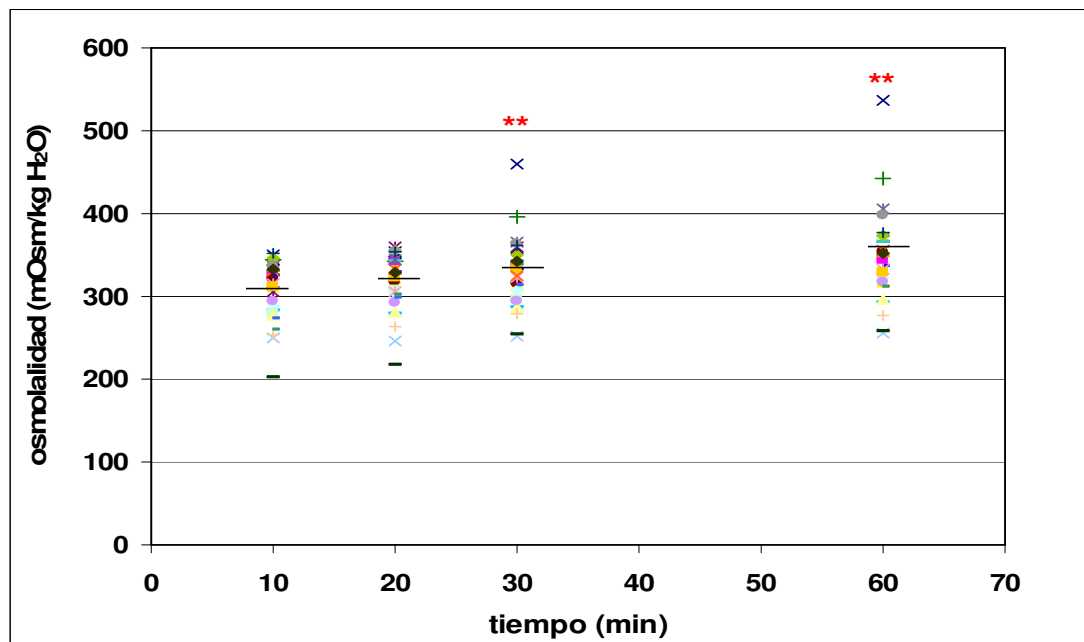


Figura 22: Variación de la osmolalidad del Plasma Seminal con el tiempo

Los plasmas seminales fueron separados de las muestras de semen, a los 10, 20, 30 y 60 min de eyaculados, mediante centrifugación 10 min a 800g para remover restos celulares, y se almacenó en alícuotas de 50 μ l a -20°C (n = 28, **: $p < 0.001$ indica para tiempos de 10 y 20 min valores inferiores respecto de 30 y 60 min).

D.3- Efecto de la osmolalidad sobre la habilidad fecundante

Los espermatozoides seleccionados fueron incubados en medio Ham's F-10 con distintas osmolalidades 280, 340 y 400 mOsm/kg (M280, M340 y M400 respectivamente, considerando al medio M280 como control). Se incubaron durante 6 o 20 h a 37°C y 5% CO₂, de acuerdo al **diseño experimental 1** descrito en materiales y métodos, luego de lo cual se evaluaron los siguientes parámetros:

D.3.1- Viabilidad

El primer punto a determinar fue si las diferentes condiciones de osmolalidad afectaban a la viabilidad de los espermatozoides. Se tomaron alícuotas de la muestra post Swim-up (original) y luego de 6 y 20 h de capacitación y se evaluó el porcentaje de células vivas. Los resultados muestran que para ninguno de los tiempos de incubación utilizados (6 y 20 h), el aumento de osmolalidad dentro de los rangos evaluados (280 a 400 mOsm/kg, **Figura 23**, n = 12) afectó la viabilidad espermática. Esto descartaría un efecto deletéreo del aumento de la osmolalidad *per se* y nos habilita para continuar con el estudio de otros parámetros del estado del espermatozoide.

D.3.2- Motilidad Subjetiva

Para evaluar si el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo era afectado por la variación en la osmolalidad, se tomaron alícuotas de la muestra original (post Swim-up) y luego de 6 y 20 h de incubación. Se evaluó el porcentaje de espermatozoides progresivos lentos y progresivos rápidos (% II+III).

Cuando se evaluó el porcentaje de espermatozoides progresivos a las 6 h de incubación, se aprecia que los valores observados no son diferentes a los de la muestra original (**Figura 24, Panel A**, NS). A las 20 h de incubación se observa que si bien no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos, todos resultan inferiores significativamente ($p < 0,01$) respecto a las muestras originales (**Figura 24, Panel B**).

La motilidad progresiva evaluada subjetivamente, tampoco se vio afectada por los distintos tratamientos en el rango de osmolalidades evaluado (280 a 400 mOsm/kg).

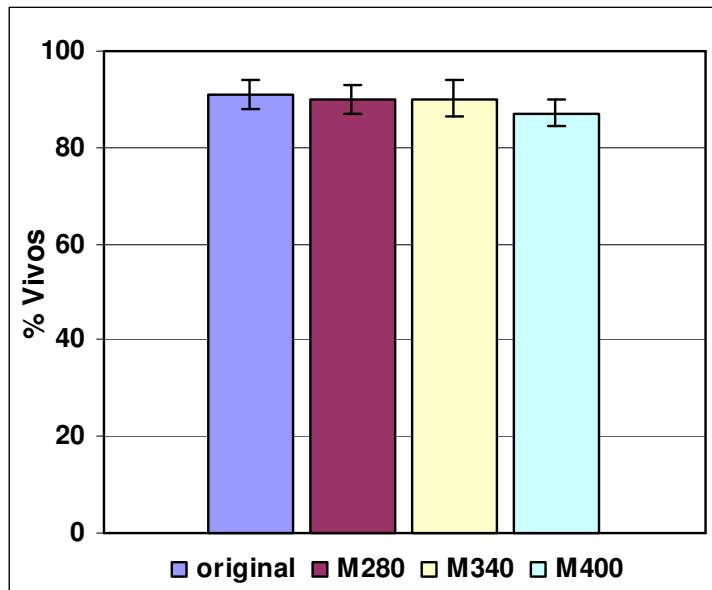
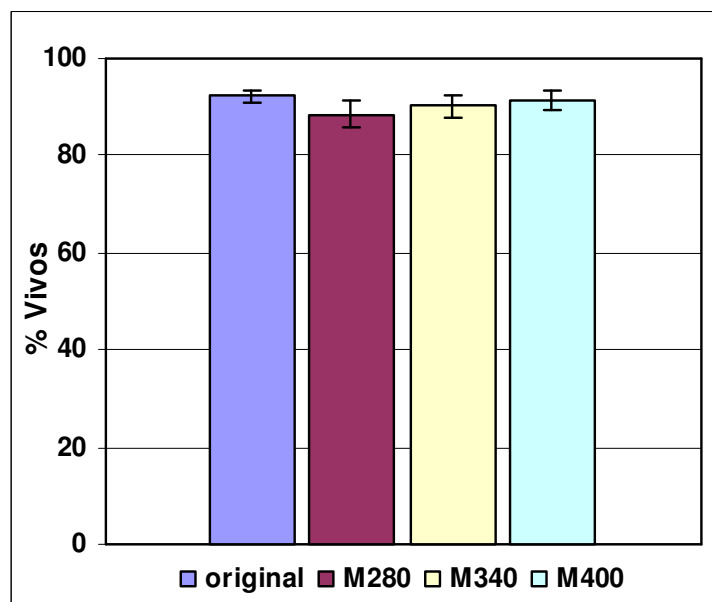
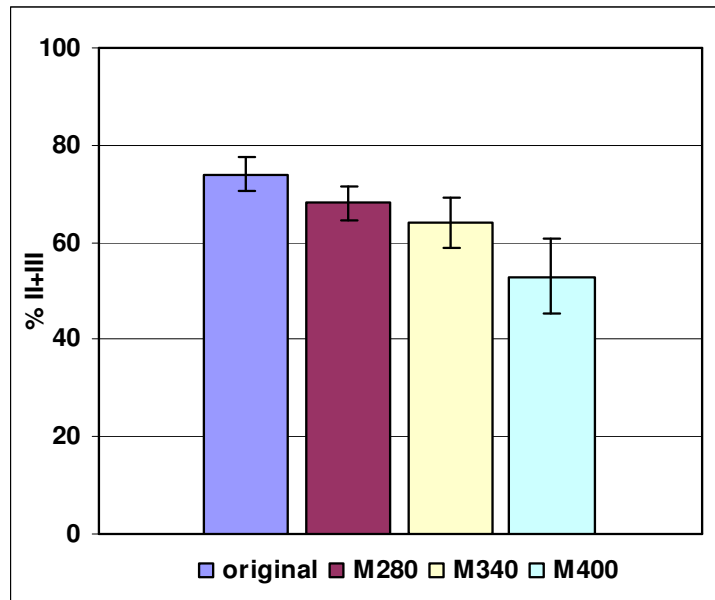
A**B**

Figura 23: Efecto de osmolalidad sobre la viabilidad de los espermatozoides humanos

Las muestras seleccionadas mediante Swup (original) en condiciones de capacitación, $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml ($n = 21$), se incubaron en Ham's F-10 suplementado con BSA 35 mg/ml y la osmolalidad modificada con sacarosa a 340 y 400 mOsm/kg, durante 6 y 20 h (M280, M340 y M400; Paneles **A** y **B** respectivamente) a 37°C y 5% CO₂. Los datos de viabilidad se presentan como media ± ES.

A



B

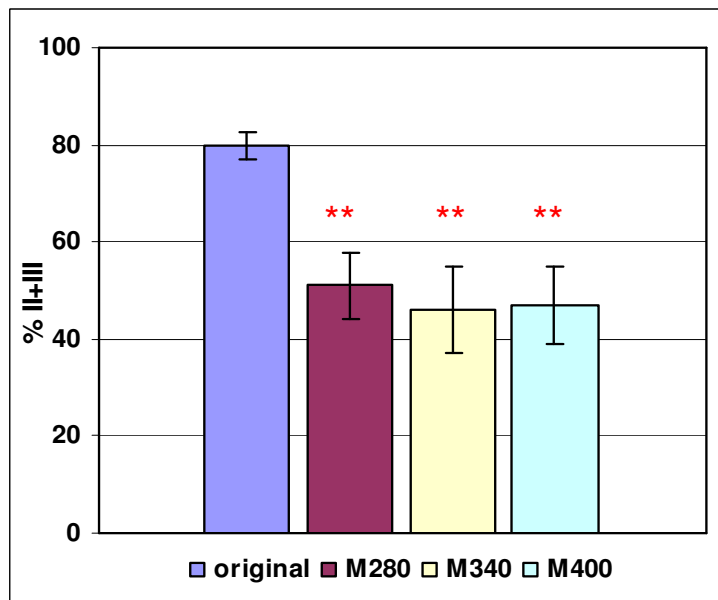


Figura 24: Efecto de la Osmolalidad sobre la motilidad subjetiva de los espermatozoides humanos

Las muestras seleccionadas mediante Swup (original) en condiciones de capacitación, $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml, se incubaron en Ham's F-10 suplementado con BSA 35 mg/ml y la osmolalidad modificada con sacarosa a 340 y 400 mOsm/kg, durante 6 y 20 h (M280, M340 y M400; Paneles **A** y **B** respectivamente) a 37°C y 5% CO₂. Los datos de movimiento progresivo (% II+III) se presentan como media \pm ES; n = 12, siendo ** p < 0.01 diferencia significativa respecto del original.

D.3.3- Fosforilación en residuos tirosina

Una vez que se descartó que la variación en la osmolalidad tuviera una acción deleterea sobre la viabilidad y el movimiento progresivo, se estudió el efecto durante el proceso de capacitación. Tal como se describió previamente en la introducción, la fosforilación de proteínas en tirosina es un estimador del estado de capacitación espermática. La capacitación está relacionada con la activación de sistemas quinasa de proteínas y esto resulta en fosforilaciones en residuos tirosina de las proteínas de los espermatozoides. Existen factores decapacitantes, como los presentes en el PS, que al aplicarlos a espermatozoides capacitados revierten el patrón de fosforilación, haciéndolo semejante al de los espermatozoides no capacitados. Por todo esto se considera al patrón de fosforilación en tirosina como un buen estimador del estado de capacitación de los espermatozoides humanos.

En este estudio se evaluó el efecto de la osmolalidad sobre el proceso de capacitación. Se estimaron los patrones de fosforilación en residuos tirosina de los espermatozoides en la muestra original no capacitada (post Swup), en los espermatozoides capacitados (6 ó 20 h) y luego expuestos al PS (20 min, 20% v/v PS, post Swup + PS) a modo de control de decapitación, y en los espermatozoides capacitados (6 y 20 h) en las condiciones de osmolalidad estudiadas (M280, M340 y M400).

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, los datos presentados sugieren que los extractos proteicos de espermatozoides incubados en medio capacitante suplementado con albúmina (M280) muestran bandas más numerosas e intensas que aquellas obtenidas a partir de espermatozoides no capacitados (post Swup vs M280). Una alícuota de los espermatozoides capacitados (6 ó 20 h) en medio control fue expuesta al PS (20 min 20% v/v) a los fines de evaluar la reversibilidad del proceso (post Swup vs post Swup + PS). Se pudo observar que, en presencia de PS, la marca resultó más ténue que para el Post Swup, indicando que la capacitación fue revertida.

Los datos muestran que luego de incubar a los espermatozoides dentro del rango de osmolalidades evaluadas (340 y 400 mOsm/kg), el proceso de fosforilación en tirosina se consigue adecuadamente, tanto a las 6 como a las 20 h. Se presenta a modo de ejemplo (ya que se encontraron patrones semejantes para los distintos pacientes y tiempos evaluados en los distintos experimentos) el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina de una muestra incubada 20 h, en la **Figura 25**. En la misma se puede observar un patrón de bandas similar en número e

intensidad correspondiente al medio control (M280). Estos patrones se observaron en los extractos de espermatozoides de todas las muestras analizadas, lo cual es indicador de una adecuada habilidad para capacitarse en las condiciones evaluadas. Estos resultados indicarían que la variación en la osmolalidad (dentro del rango fisiológico evaluado) no es un factor que afecte las etapas que conducen a la fosforilación de proteínas en residuos tirosina, lo cual está ligado a la capacitación.

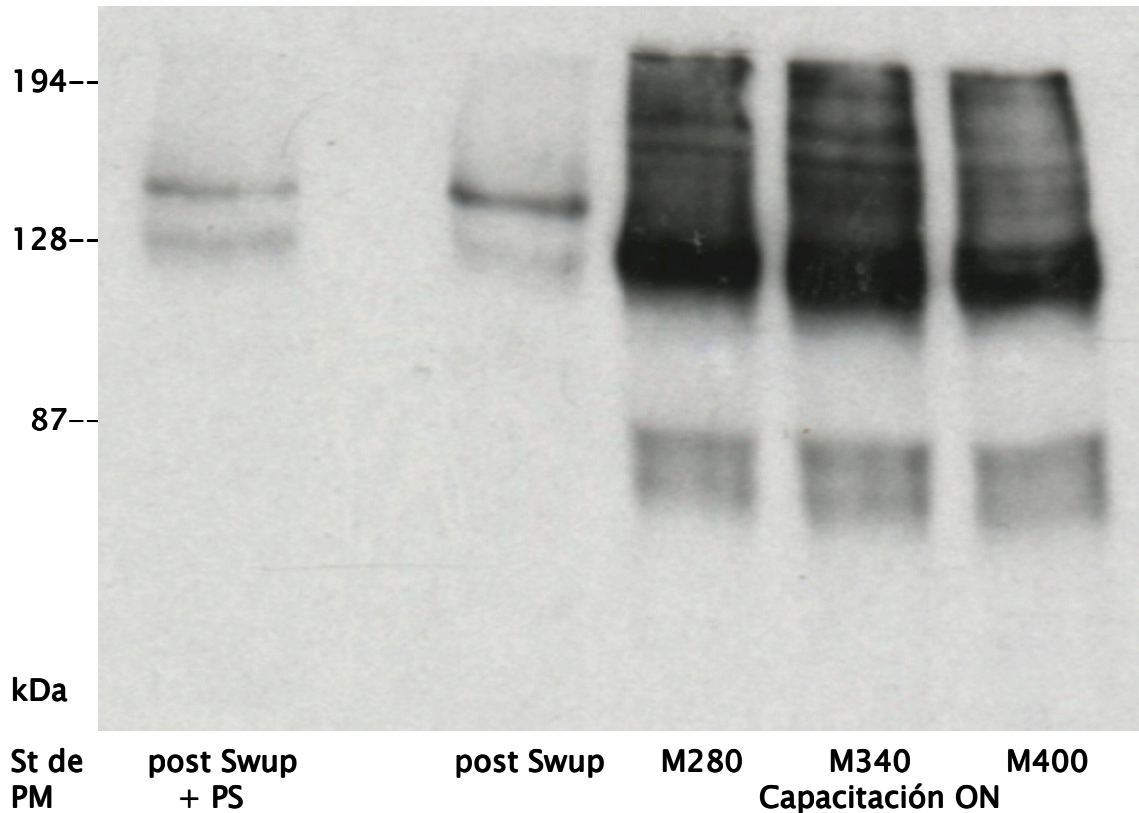


Figura 25: Efecto de la exposición a medios de osmolalidades diferentes sobre el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

Una de las autorradiografías obtenida, a modo de ejemplo, de las bandas de proteínas fosforiladas en las distintas condiciones estudiadas. Los espermatozoides no capacitados (post Swup), fueron expuestos al plasma seminal (decapacitante, post Swup + PS) o capacitados 20 h en los distintos medios (280, 340 y 400 mOsm/kg) suplementados con BSA. El patrón fue analizado por la técnica de Western Immunoblott utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina. En el margen izquierdo se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

D.3.4- Reacción Acrosomal

Habiendo determinado que dentro del rango fisiológico, la variación de la osmolalidad, no afectaba al proceso de capacitación, se procedió a evaluar si los espermatozoides bajo estas condiciones estaban preparados para sobrellevar la

etapa posterior de liberación del contenido acrosomal. Para ello, una alícuota de los espermatozoides capacitados por 6 ó 20 h en las distintas condiciones de osmolalidad propuestas, fue tratada con un pulso de 20% v/v de FF.

Se evaluaron los patrones de tinción con lectina *Pisum sativum*, identificando los espermatozoides reaccionados según se detallo en materiales y métodos. Se consideró reaccionados totales (%RT) a la suma de los espermatozoides con patrones SE y Parche.

Como se observa en la figura **Figura 26** Panel **A**, a las 6 h de incubación no se encontraron diferencias significativas en el % de RA basal ni inducido para ninguna de las condiciones estudiadas. Este hallazgo no fue sorprendente ya que ha sido reportado que se necesita un mínimo de 8 h de incubación previa para generar respuesta ante un inductor fisiológico de la RA como el FF (Calvo y col 1989). Esto estaría indicando que a tiempos menores a 8 h la variación en la osmolalidad, dentro de los rangos estudiados, no generaría *per se* un estímulo que modifique el estado acrosomal.

Al evaluar la RA luego de 20 h de incubación, se observó el aumentó significativo del porcentaje de espermatozoides que perdieron espontáneamente el acrosoma, a medida que aumentó la osmolalidad del medio, sin que se vieran afectadas la viabilidad ni la habilidad para capacitarse y responder a un estímulo fisiológico como es el FF, (**Figura 26** Panel **B**). Esto indica que los espermatozoides capacitados ON en medios de osmolalidades entre 340 y 400 mOsm/kg pierden espontáneamente su acrosoma (%RT) en grado significativamente mayor que para el medio habitualmente utilizado M280 ($p < 0.001$). Los espermatozoides capacitados ON en medios de osmolalidad de 340 y 400 mOsm/kg, responden al inductor de modo significativamente mayor que el control (mayor %RT para M340+FF y M400+FF, que para M280+FF, $p < 0.05$).

Como este efecto solo se evidencia a mayor tiempo de incubación, o sea a las 20 h, estaría indicando que el efecto de la osmolalidad sobre la RA sería dependiente del estado de capacitación y se asociaría a estadios tardíos dentro del proceso. Esto no se evidencia en la fosforilación de tirosina que es un evento temprano.

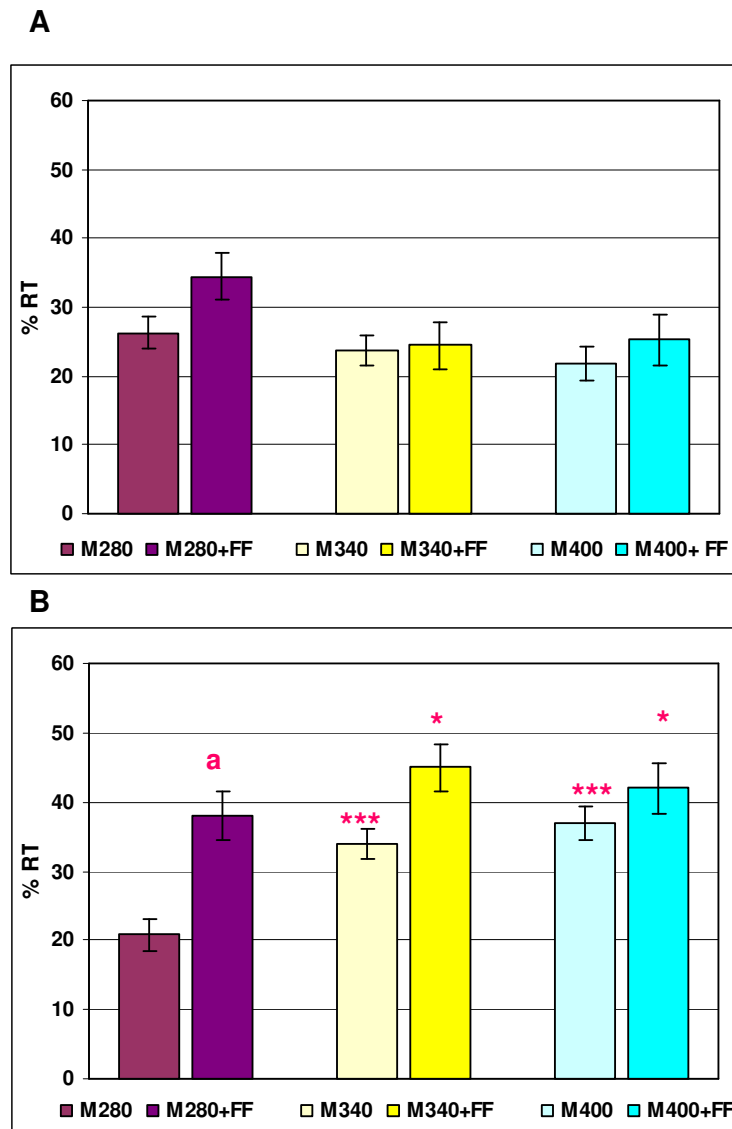


Figura 26: Osmolalidad y reacción acrosomal

Los espermatozoides se capacitaron en Ham's F-10 suplementado con BSA 35 mg/ml con las diferentes condiciones de osmolalidad utilizando sacarosa (M280, M340 y M400) durante 6 y 20 h (Paneles **A** y **B**, respectivamente) a concentración de $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml a 37°C y $5\% \text{CO}_2$. Luego se indujo la RA durante 30 min con 20% de FF v/v. Los datos se expresan como media \pm ES, $n = 11$, **a**: indica %RT significativamente mayor que M280 ($p < 0.001$), *******: indica %RT significativamente mayor que M280 ($p < 0.001$), *****: indica %RT en respuesta al inductor fisiológico de la RA en grado significativamente mayor que en M280+FF ($p < 0.05$).

D.3.5- Población inducible

La población inducible (PI) se ha definido como la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides que sobrellevaron la RA inducida menos el porcentaje de

espermatozoides reaccionados basal o espontáneo (sin inductor), este valor indica la población de espermatozoides que responden al inductor fisiológico de la RA y que tendría mayores posibilidades de reaccionar en las envolturas ovocitarias y fecundar al ovocito.

Al analizar los datos, se determinó que la población inducible es significativamente mayor para los espermatozoides capacitados 20 h en condiciones del control (M280, $p < 0.01$), debido a que hay mayor %RT en los basales para las otras condiciones de osmolalidad. Para todas las condiciones de osmolalidad (M280, M340 y M400), se observa la respuesta al inductor con un aumento de %RT, solo significativo respecto de su basal para M280. Para identificar donde se origina esta diferencia, se evaluaron las PI según los diferentes patrones (Parche y SE) para las diferentes condiciones (M280, M340 y M400, **Figuras 27 y 28**).

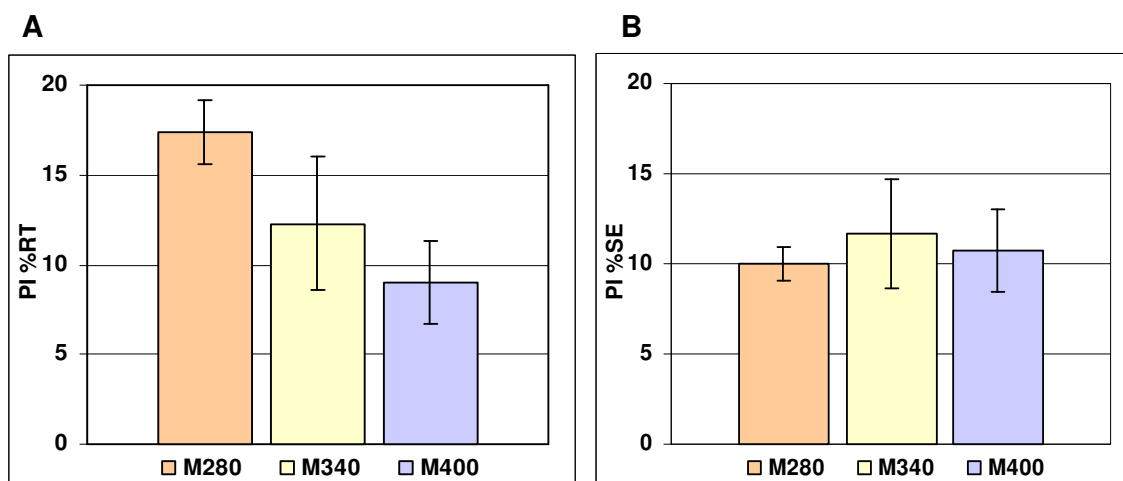


Figura 27: Osmolalidad y población inducible

Los espermatozoides se capacitaron en medio Ham's F-10 suplementado con BSA 35 mg/ml para las diferentes condiciones de osmolalidad utilizando sacarosa (M280, M340 y M400) durante 20 h a concentración de $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml a 37°C y 5% CO_2 . Luego se indujo la RA durante 30 min con 20% de FF v/v. En ambos paneles se preseta la PI (inducido-basal, I-B). Se observa en el Panel **A** la PI de espermatozoides RT y en el Panel **B** la PI de los SE. Los datos se presentan como media \pm ES, $n = 11$.

Tal como se describieron en materiales y métodos, se presentan en la **Figura 28**, panel izquierdo los diferentes patrones (arriba Parche y no reaccionados y abajo SE y no reaccionados). Al analizar las PI para cada patrón por separado, se determinó una disminución de la PI a expensas de la población con patrón Parche, mientras para SE no hubo diferencias. Los espermatozoides que presentaban este

patrón disminuyeron significativamente con la osmolalidad creciente, tal como se muestra en la **Figura 28** (panel derecho).

Si disminuye la PI disminuyen las posibilidades de fecundación ya que los espermatozoides con acrosoma intacto son los que, al llegar a la superficie del ovocito, tendrían la capacidad de unirse y penetrarlo. Se considera a los espermatozoides que presentan patrón Parche como los que representan a la población viable en vías de reaccionar. Estos resultados sugerirían que si bien el espermatozoide expuesto a distintas osmolalidades es capaz de sobrevivir y lograr al menos los pasos que llevan a la fosforilación en tirosina de proteínas ligadas a la capacitación, un aumento en la osmolalidad podría disminuir la cohorte de espermatozoides con posibilidades para fecundar.

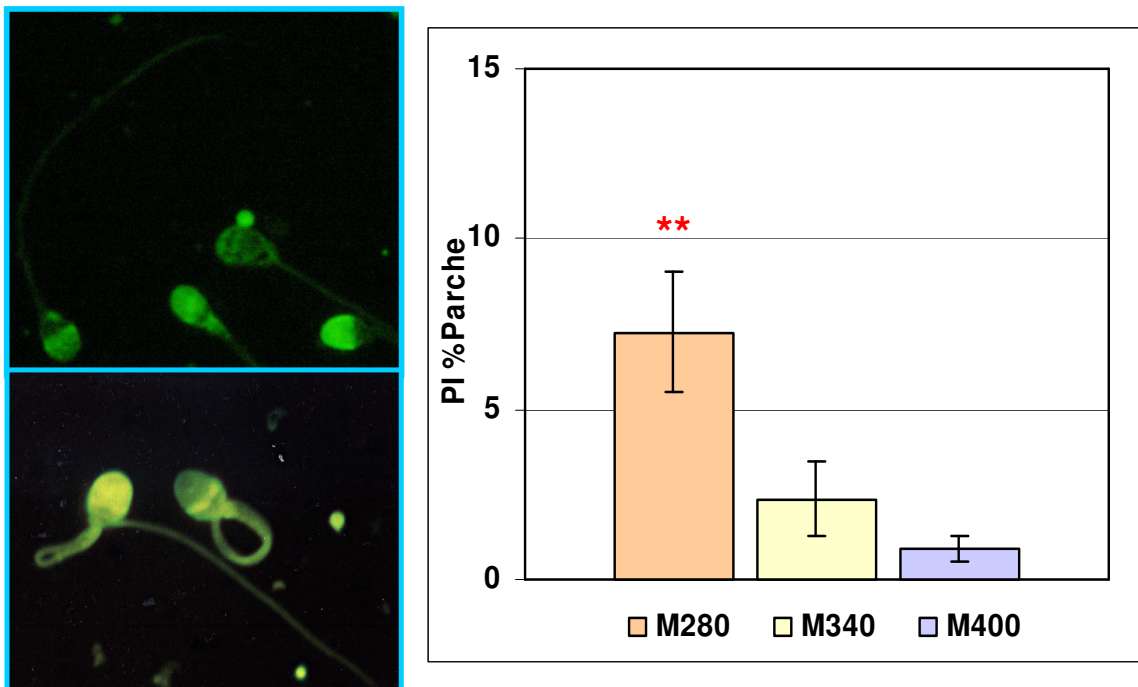


Figura 28: Osmolalidad y población inducible, patrón Parche

Los espermatozoides se capacitaron en medio Ham's F-10 suplementado con BSA 35 mg/ml para las diferentes condiciones de osmolalidad utilizando sacarosa (M280, M340 y M400) durante 20 h a concentración de $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml a 37°C y 5% CO₂. Luego se indujo la RA durante 30 min con 20% de FF v/v. A la izquierda se presentan las microfotografías (1000x con epifluorescencia) de los espermatozoides con patrón Parche arriba (acrosoma punteado) y abajo con SE, ambos indican espermatozoides reaccionados mientras que el acrosoma intacto (acrosoma con fluorescencia completa en ambas) representa los espermatozoides no reaccionados. A la derecha se presenta para las diferentes condiciones evaluadas, la PI (inducido - basal) del patrón Parche. Los datos se presentan como media ± ES, n = 11, donde **: p < 0.01 significativamente mayor para el control respecto de M340 y M400.

D.4.- Ensayos de Bloqueo de Canales de K⁺ Sensibles a Quinina

En este trabajo se demostró que cuando el espermatozoide abandona el PS para comenzar el ascenso por el tracto femenino, encuentra medios de osmolalidades menores al PS (tal como se presenta en la **Tabla 1**), por lo que es de esperar que exista un stress hipoosmótico que deberá contrarrestar para regular su volumen.

El ión K⁺ cumple una función importante en el equilibrio osmótico a través de las membranas plasmáticas por su estrecha relación con el movimiento de H⁺, Na⁺ y agua en los distintos tipos celulares entre ellos el espermatozoide. Ante un desafío hipoosmótico la célula equilibra su medio interno mediante un eflujo de iones o una entrada de agua. Si los canales no están funcionales o están bloqueados se observará que no le es posible regular su volumen, por lo que la célula se hinchará.

Con el fin de evaluar la participación de canales de K⁺ en la regulación del equilibrio osmótico en espermatozoides humanos, se utilizó un inhibidor selectivo de canales de K⁺, una sal soluble de Quinina. El espermatozoide, al ser separado del PS mediante la técnica de Swim-up, es forzado a pasar a un medio de osmolalidad de 280 (M280), y tal como se ha demostrado deberá regular su volumen. Si este proceso de equilibrio no ocurre, es de esperar que se vea comprometida su funcionalidad. Al ser bloqueados los canales de K⁺, mediante Quinina, si es el K⁺ la molécula osmóticamente activa utilizada para la regulación del volumen, el espermatozoide modificará algún parámetro que describa su funcionalidad.

D.4.1- Determinación de la concentración adecuada de Quinina

En un estudio preliminar se determinó la concentración adecuada de Quinina de modo que no resultara tóxica para los espermatozoides (según **diseño experimental 2** descrito en materiales y métodos). Se utilizó como parámetro para tomar la decisión de cual concentración resultaba adecuada, que la concentración de Quinina utilizada no disminuyera significativamente la sobrevivencia ni el % de espermatozoides móviles respecto al control. Se estudiaron dos concentraciones diferentes, descritas en la literatura, de Quinina (Q), como Sulfato de Quinina: Q₁: 62,5 µM y Q₂: 125 µM. Los espermatozoides fueron expuestos a un Swim-up por 1 h con los medios: control (C), Q₁ y Q₂ y se evaluó en todos ellos la viabilidad y la motilidad. Al evaluar el efecto de ambas concentraciones, se determinó que en presencia de Q₂ los valores de viabilidad y motilidad fueron significativamente

menores que para el control descartándose esta concentración (**Figura 29**; $n = 8$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$, respectivamente).

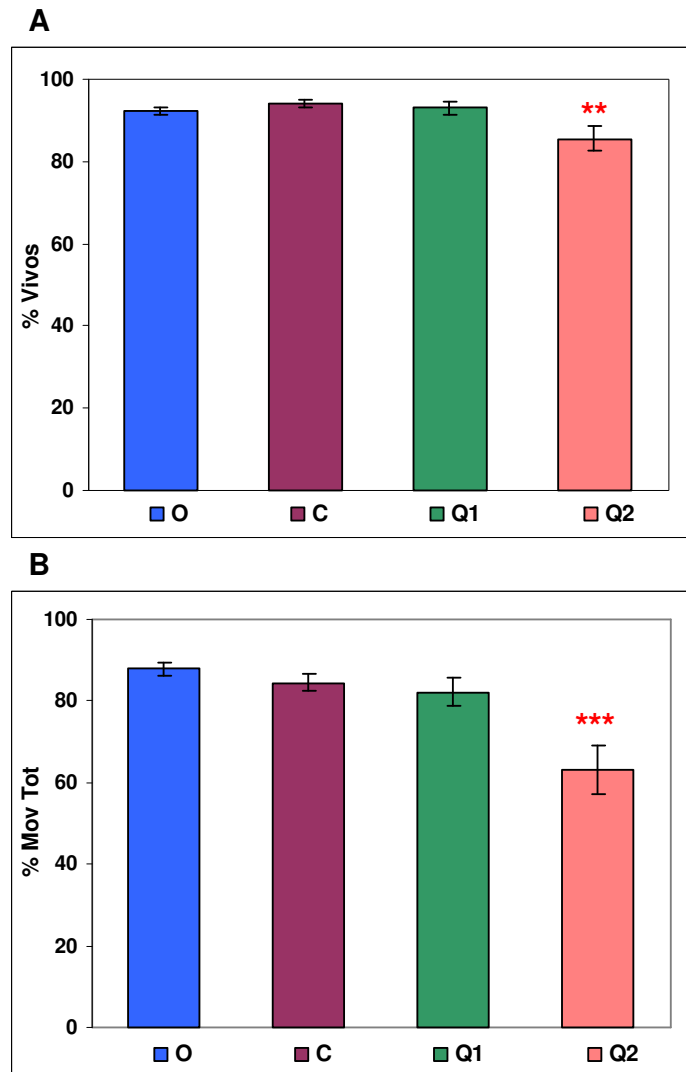


Figura 29: Acción de la Quinina según la concentración sobre la viabilidad (A) y la motilidad (B)

Se determinó la concentración adecuada de Quinina ($n = 8$) en muestras de semen con más de 20×10^6 esp./ml y más de 50% de espermatozoides móviles, los espermatozoides móviles fueron obtenidos mediante Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml: C), en ausencia (control) o presencia del inhibidor de canales de K^+ (C y Q respectivamente). Siendo O: original, C: control, Q₁: 62,5 μ M, Q₂: 125 μ M. Los datos se expresan como media \pm ES, diferencias respecto de O, C y Q₁ en el Panel **A** en la viabilidad ($** p < 0.01$) y en el Panel **B** en la motilidad ($*** p < 0.001$).

Una vez definida la concentración adecuada de Quinina (Q₁: 62,5 μ M), se evaluó si la preincubación de 1 h con el inhibidor selectivo de K^+ modificaba la

capacidad de los espermatozoides al exponerse a un salto hipoosmótico. La funcionalidad espermática se evaluó mediante la cinética del movimiento, el porcentaje de formas normales, el índice de anomalías múltiples y la reacción acrosomal inducida en espermatozoides previamente capacitados. La reversibilidad del proceso también fue analizada por los mismos parámetros, según el **diseño experimental 3**, descrito en materiales y métodos.

D.4.2- Cinética del movimiento

Si el inhibidor actúa sobre el canal que participa en la regulación del volumen espermático, sería de esperar, que al fallar la regulación ingresaría agua a la célula, cambiaría su volumen, y podría verse esto reflejado en el movimiento. Se utilizó para este fin el análisis del movimiento objetivo (CASA). Este es un método, que por su sensibilidad, puede evaluar más fidedignamente los cambios en los patrones de movimiento. Se basa en el estudio cinético de los parámetros (VSL, VAP, LIN y ALH), tal como se describió en materiales y métodos.

Como se puede observar en la **Figura 30**, en presencia de inhibidor (Q a 62,5 μM) los parámetros cinéticos VSL, VAP y LIN resultaron inferiores y la ALH superior con respecto al control y los respectivos lavados (C, Lav C y Lav Q, $n=21$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$) sin que se afecte la viabilidad ($> 90\%$ en todos los casos).

Esto confirma el cambio en el patrón de movimiento a expensas de la inhibición de los canales de K^+ por un movimiento menos progresivo y veloz ($< \text{VSL}$, $< \text{VAP}$) y menos lineal ($< \text{LIN}$ y $> \text{ALH}$) como se aprecia en las trayectorias presentadas en la **Figura 31** a modo de ejemplo. Nótese las particularidades del movimiento de los espermatozoides tratados con el inhibidor, que presentan trayectorias menos lineales tal como se describe a través de sus parámetros cinéticos del movimiento.

Esto sugiere que cuando el espermatozoide sufre un shock hipoosmótico y no tiene capacidad para regular su volumen a través del intercambio de iones K^+ , su cinética de desplazamiento se torna menos veloz y menos lineal, aumentando el desplazamiento lateral de la cabeza respecto de la trayectoria media. Este efecto se revierte cuando, luego de la exposición a la Quinina, los espermatozoides son lavados y se resuspenden en medio de cultivo, retomando los valores de los espermatozoides en medio control. Ninguna de las variables cinéticas analizadas resultó diferente en los controles que fueron centrifugados y resuspendidos en medio control, esto descarta que la centrifugación en sí misma haya tenido un posible efecto

deletereo. De igual modo las viabilidades en todos los tratamientos resultaron superiores al 90%.

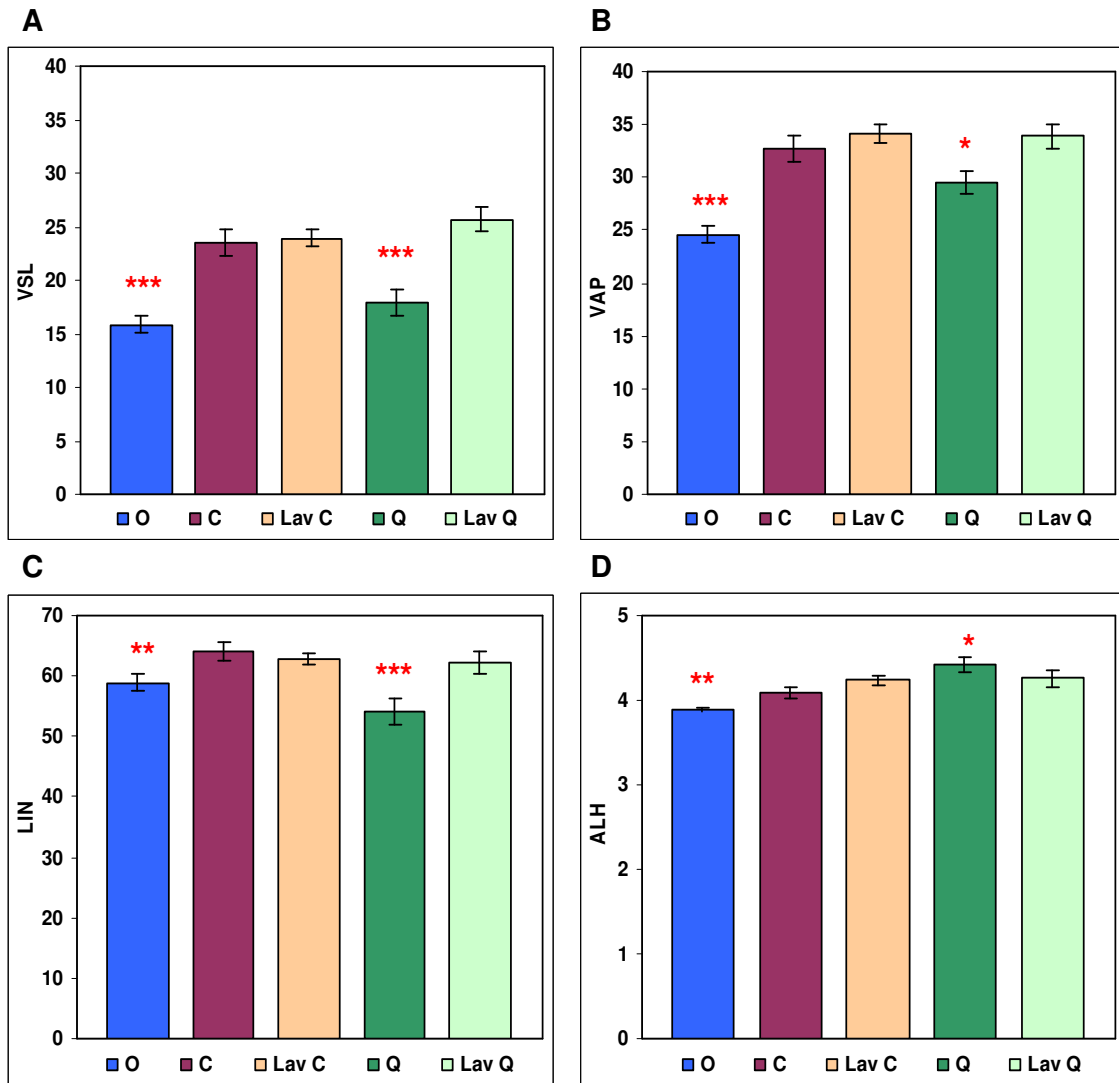


Figura 30: Acción de la Quinina sobre los parámetros cinéticos del movimiento

En muestras de semen con más de 20×10^6 esp./ml y más de 50% de espermatozoides móviles, los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml: C), en ausencia (control) o presencia del inhibidor de canales de K^+ (C y Q respectivamente). Panel **A** velocidad rectilínea (VSL), Panel **B** velocidad de camino medio (VAP), Panel **C** linealidad (LIN) y Panel **D** desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Siendo O: original, C: control (M280), Lav C: alícuota de C lavado, Q: 62,5 μ M de Quinina, Lav Q: alícuota de Q lavado. Los datos se expresan como media \pm ES, y las diferencias significativas respecto de C, Lav C y Lav Q según * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, $n = 21$.

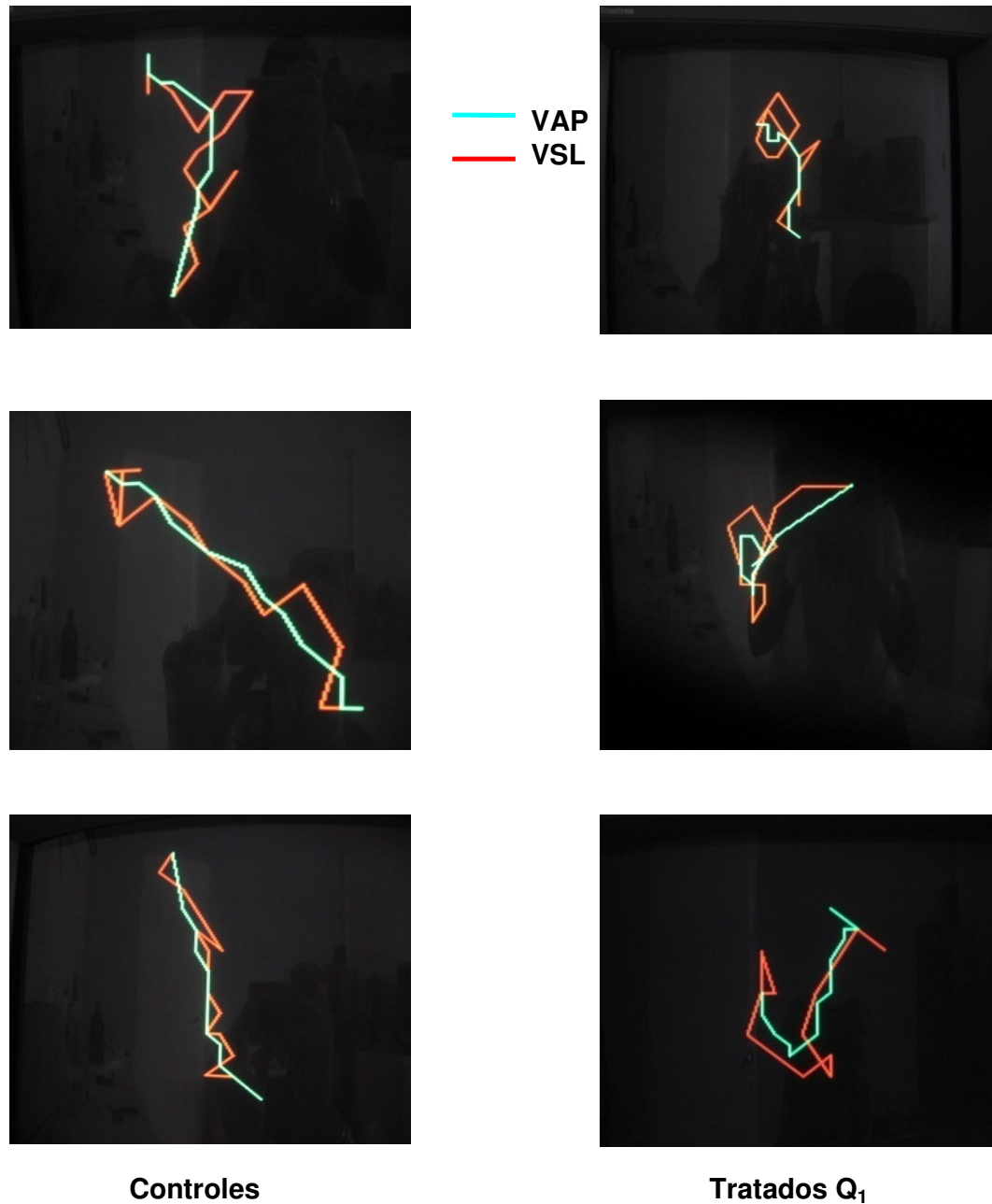


Figura 31: Trayectorias de las muestras Controles y tratadas con Quinina (Q₁)
 Se destacan VAP y VSL respectivamente. Las imágenes obtenidas son procesadas por el sistema CASA y presentadas en la pantalla y fotografiadas.

D.4.3- Morfología

Según se ha descrito en este trabajo, el espermatozoide humano regula su volumen frente a cambios de osmolalidad del medio en que se encuentra. Debido a la pequeña relación existente entre superficie y volumen (prácticamente inexistencia de citoplasma), debe modificar su forma. A modo de ejemplo se puede citar la respuesta

al shock hipoosmótico que se refleja mediante un enrulamiento inespecífico del flagelo utilizado como principio del Test Hipoosmótico, el cual evalúa la integridad de membrana plasmática (OMS, 1999). Para evaluar si la acción inhibitoria de la Quinina, sobre el movimiento, se encontraba relacionada con un cambio en la forma del espermatozoide se evaluó la morfología a 1000x a través del % de formas normales, las anomalías del flagelo y el Índice de anomalías múltiples (IAM). Además se analizó la reversibilidad de dicha acción mediante el lavado y resuspensión en medio sin inhibidor.

Según se puede observar en la **Figura 32**, mientras que el % de formas normales no presentó diferencias significativas (Panel A), el % de anomalías de flagelo fue mayor en presencia de inhibidor (Q a 62,5 μ M) que para el control y su lavado (C y Lav C respectivamente, n = 21; ** p < 0.01, Panel B).

Las diferencias observadas en el IAM cuando esta presente el inhibidor (Q, **Figura 32** Panel C; n = 21; * p < 0.05, para C: $1,41 \pm 0,04$ y Q: $1,56 \pm 0,04$) se asociarían al efecto sobre el flagelo. Estos resultados apoyarían la idea de que en presencia del inhibidor, el cual no le permite regular el desequilibrio sacando K^+ , el espermatozoide al salir del PS sufriría un stress hipoosmótico que lo haría incluir agua a expensas de modificar la histología del flagelo. Esto explicaría que se muevan con menor linealidad porque presentan modificaciones a nivel del flagelo.

D.4.4- Reacción Acrosomal

Los resultados previos sugerían un efecto del inhibidor específico de canales de potasio cuando los espermatozoides separados del PS se exponían a este. Como fue descrito previamente, se observaron cambios en el movimiento y en la morfología del flagelo del espermatozoide. Entonces surgió una nueva hipótesis de trabajo, y fue ver si el efecto también se reflejaba en una modificación de su habilidad fecundante. Para ello, los espermatozoides recuperados y tratados o no con Q (62,5 μ M), fueron capacitados 20 h (ON) en medio libre de Q y luego inducidos a responder a un inductor fisiológico de la RA, como es el FF.

La capacidad de responder al inductor fue significativa en todos los casos respecto de sus basales (n = 6, **a**: p < 0.01; **Figura 32**, Panel **A**). Estos resultados indicarían que el inhibidor, no modificaría ni el estado acrosomal de los espermatozoides ni su habilidad para responder a un inductor fisiológico como es el FF.

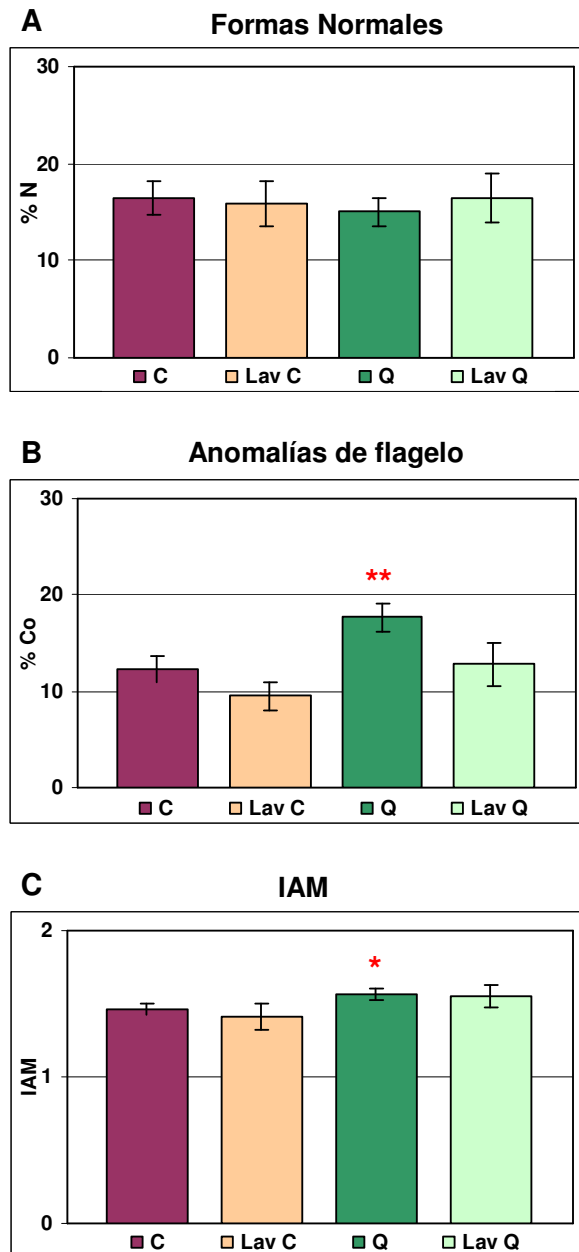


Figura 32: Morfología, Quinina y reversibilidad de su efecto

Muestras de semen con más de 20×10^6 esp./ml y más de 50% de espermatozoides mótiles ($n = 21$). Los espermatozoides mótiles fueron seleccionados por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml, C), en ausencia (control: C) o presencia del inhibidor de canales de K^+ (Q) y la reversibilidad por lavado 5 min 600g y resuspensión en medio C. Panel **A** % de formas normales (%N), Panel **B** anomalías de flagelo (%Co) y Panel **C** Índice de anomalías múltiples (IAM). Siendo C: control (M280), Lav C: alícuota de C lavado, Q: 62,5 μ M de Quinina, Lav Q: alícuota de Q lavado. Datos expresados como media \pm ES, diferencias significativas respecto de C, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Los espermatozoides expuestos a Quinina y luego lavados (Q Lav ON) presentaron un mayor %RT respecto del control y de los bloqueados ($n = 6$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respectivamente). Al evaluar los diferentes patrones (Parche y SE) no se encontraron diferencias significativas, aunque para Q Lav ON se apreció una mayor diferencia entre el inducido respecto del basal para el patrón SE.

D.4.5- Población inducible

La PI es un parámetro que indica la población de espermatozoides con posibilidades de fecundar al ovocito. En esta etapa se evaluó si el bloqueo de los canales afectaba a la PI y de haber efecto, si el mismo era reversible, o sea, si cesaba al removerse el inhibidor.

Se evaluó la población inducible total (**Figura 33**, Panel **B**). Al analizar los datos se determinó que la PI no fué diferente para los diferentes tratamientos. En todos los casos las PI estuvieron por encima del 15%, lo cual da una referencia respecto de la respuesta al inductor.

La acción inhibitoria (de Quinina sobre el canal de K^+) es reversible, sugiriendo una unión débil del inhibidor al espermatozoide. Estos resultados indicarían que las poblaciones que responden al inductor fisiológico no son afectadas por el inhibidor, por lo cual se estima que el efecto del inhibidor esta en las etapas de migración y no de capacidad fecundante.

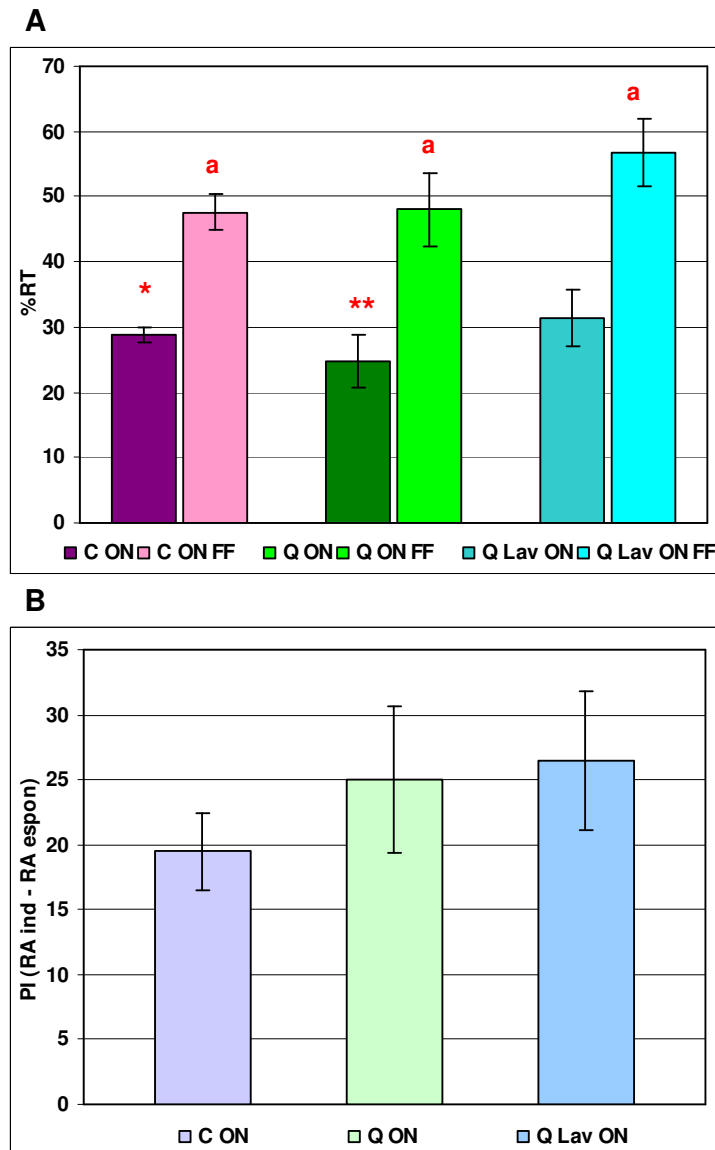


Figura 33: Acción de la Quinina sobre la Reacción Acrosomal inducida en espermatozoides capacitados 20 h

Muestras de semen con más de 20×10^6 esp./ml y más de 50% de espermatozoides móviles. Los espermatozoides móviles fueron seleccionados por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml) y se incubaron en las diferentes condiciones durante 20 h a concentración de $2-10 \times 10^6$ esp.móviles/ml a 37°C y 5% CO_2 . Luego se indujo la RA 30 min con 20% de FF v/v en ausencia (control: C) o presencia del inhibidor de canales de K^+ (Q) y la reversibilidad por lavado 5 min 600g. Se presenta la media \pm ES del % de espermatozoides reaccionados totales y la población inducible (%RT y PI, Paneles A y B respectivamente), siendo C ON: control (M280), Q ON: 62,5 μM de Quinina, Q Lav ON: alícuota de Q lavado, y sus respectivos inducidos C ON FF, Q ON FF y Q Lav ON FF; n = 6, **a**: p < 0.01 respecto de sus basales; y * p < 0.05 y ** p < 0.01 respecto de Q Lav ON.

D.5- El uso de crioprotectores como modelo de contacto con medio hiperosmolal

Cuando se necesita criopreservar una célula, se la expone a una solución de alta osmolalidad con el objetivo de sacar el agua de la misma, deshidratándola. Estas soluciones se utilizan para prevenir la formación de cristales de agua intracelulares cuando, durante la criopreservación, se exponen las células a muy bajas temperaturas, lo que podría deteriorarlas.

Las soluciones crioprotectoras son hiperosmolales y ese fue el motivo de la elección para utilizarlas en este trabajo, con el fin de investigar su acción sobre la función espermática. Se desarrolló un modelo *in vitro* de aplicación Clínica, respetando las condiciones habituales del manejo de las muestras de semen.

En primer lugar se evaluó la osmolalidad de diferentes soluciones crioprotectoras comerciales, comúnmente utilizadas para la criopreservación de los espermatozoides humanos, así como la osmolalidad resultante de la mezcla crioprotector-semen, con la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados se presentan en la **Tabla 2** junto con las osmolalidades de medios utilizados habitualmente en la recolección, selección y lavado de espermatozoides humanos. Para eliminar la presencia del crioprotector, en algunos casos, los espermatozoides son tratados mediante columnas conteniendo un polímero sintético (Percoll), por lo cual se incluyó su osmolalidad en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Osmolalidades de medios utilizados habitualmente en la recolección, selección y lavado de espermatozoides humanos. Siendo PS: plasma seminal

Muestra	Media \pm ES (mOsm/kg)
PS (n = 21)	386 \pm 12
Ham's F10 (n = 8)	280 \pm 7
Percoll 90% (n = 3)	328 \pm 3
Medios Crioprotectores (n = 3)	2309 \pm 239
Semen:Medio Crioprotector (n = 6)	1157 \pm 19

En esta etapa, nuestro objetivo fué evaluar lo que ocurre cuando los espermatozoides criopreservados en las soluciones crioprotectoras disponibles en el mercado (con osmolalidades muy elevadas > 2000 mOsm/kg), eran liberados del crioprotector en un medio de cultivo estandard de 280 mOsm/kg. Se realizaron estudios en muestras criopreservadas mediante protocolo de uso habitual, y se analizó además, la introducción de inhibidores de canales iónicos, para estudiar su participación frente a este desafío osmótico.

D.5.1- Crioprotector o Criopreservación?

Como primer objetivo se estudió separadamente el efecto del crioprotector *per se* y luego la conservación a temperaturas bajas (-196°C) sobre la función del espermatozoide. Se evaluó, en una primera instancia: a) la acción de la mezcla del semen con la solución crioprotectora y b) el efecto del crioprotector sumado a la disminución de la temperatura al ser conservada en N₂ líquido.

Se trabajó con muestras procesadas por el protocolo habitual de criopreservación. Así se analizó la muestra original (semen: O), luego la muestra que resulta de la mezcla 1:1 v/v semen:crioprotector (C s/criopres) una vez estabilizada esta mezcla, y luego de ser conservada a -196°C en N₂ líquido, finalmente cuando es nuevamente estabilizada a temperatura ambiente (Criopreservada “descongelada”: Criopres).

En la **Figura 34** se presentan a modo de ejemplo algunas imágenes de los preparados donde se aprecian los espermatozoides recuperados post criopreservación, fijados y teñidos con Hematoxilina 30% en la parte superior, mientras que en la inferior se pueden observar los preparados para la evaluación de la RA mediante tinción con lectina *Pisum sativum*. Se observan espermatozoides muy hinchados, con flagelos enrollados y a su vez, a pesar de estas anomalías morfológicas, se puede apreciar que algunos espermatozoides presentan acrosomas intactos o con los patrones establecidos como Parche y SE.

No se encontraron diferencias significativas, para el número de espermatozoides vivos, ni para el estatus acrosomal entre ambos procedimientos (antes y después de ser expuestos a baja temperatura), tal como se presenta en la **Figura 35** (Paneles **A** y **B** respectivamente). Cabe destacar que al evaluar el estatus acrosomal para ambas situaciones, se determinó que el %RT fue superior al 60%.

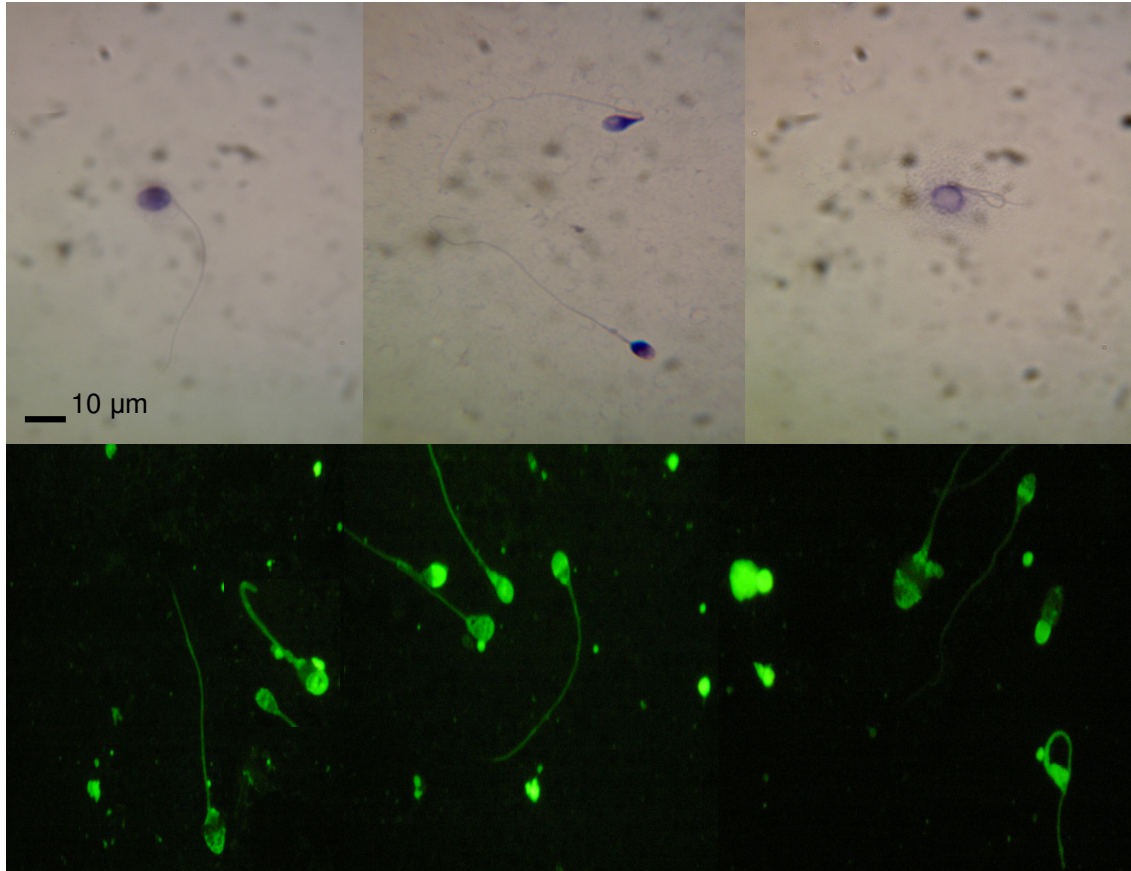


Figura 34: Morfología y RA de espermatozoides Criopreservados

Aspecto que presentan los espermatozoides criopreservados y descongelados. En microscopio óptico y con epifluorescencia. A pesar de que algunos espermatozoides presentan cabezas de aspecto anormal, el acrosoma esta presente (aumento 1000x).

La evaluación morfológica muestra que la deshidratación controlada que produce la exposición al crioprotector no se reflejaría en cambios a nivel morfológico evidenciables microscópicamente, ya que no hubo diferencias significativas entre el % de formas normales en la muestra original con respecto al de los espermatozoides en contacto con el crioprotector (**Figura 35, O vs C s/criopres, NS**). Sin embargo, se determinó para los espermatozoides expuestos al medio hiperosmolal de crioprotección, una vez conservados a -196°C , cuando finalmente son estabilizados a 37°C , que el % de formas normales disminuye significativamente respecto al original (**Figura 35, Criopres vs O, $p < 0.05$**).

Estos resultados sugerirían que, en este caso, el aumento de la osmolalidad no sería *per se* la causa de la disminución del número de formas normales, sino que el efecto deletereo del procedimiento sobre el número de formas normales, estaría

significativamente incrementado durante el enfriamiento, sin que se afecte la viabilidad en forma significativa.

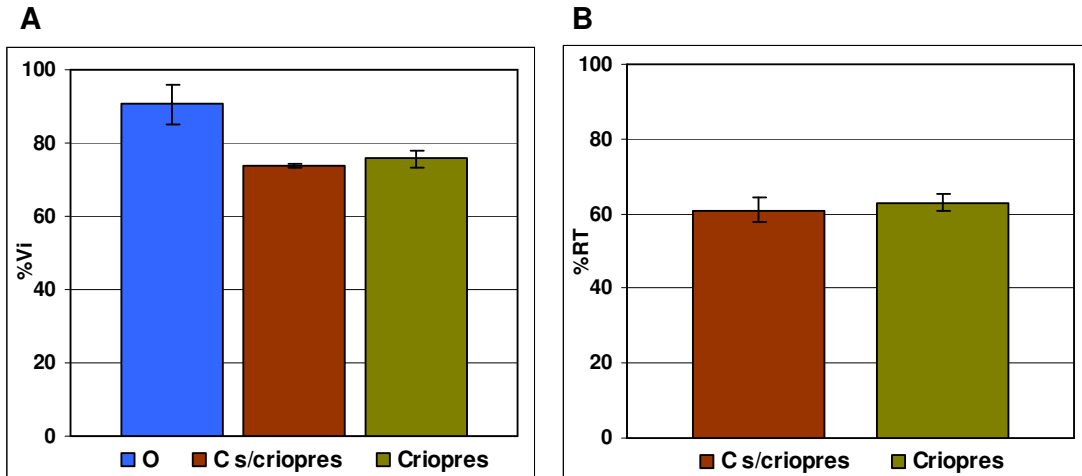


Figura 35: Viabilidad, Reacción Acrosomal y efecto del crioprotector y la criopreservación

Se utilizaron muestras de semen tratadas con el protocolo de criopreservación detallado previamente. Siendo O: original, C s/criopres: mezcla semen:crioprotector sin criopreservar y Criopres: mezcla semen:crioprotector y criopreservada. En los Paneles **A** y **B** se presenta la media \pm ES de los % de espermatozoides Viables y Reaccionados Totales respectivamente (%Vi y %RT, NS, n = 3).

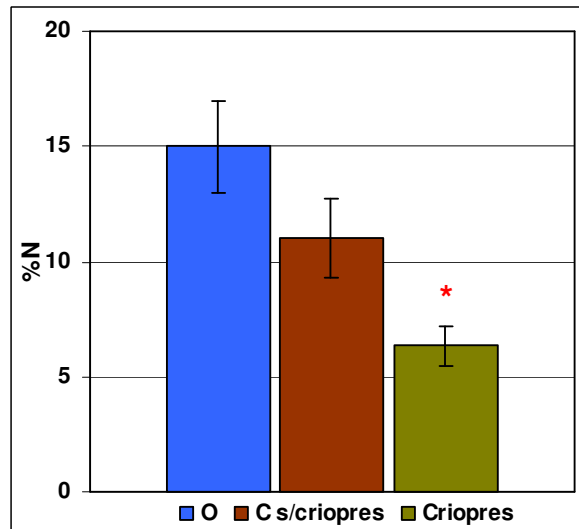


Figura 36: Morfología y efecto del crioprotector y la criopreservación

Se utilizaron muestras de semen tratadas con el protocolo de criopreservación detallado previamente. Siendo O: original, C s/criopres: mezcla semen:crioprotector sin criopreservar, Criopres: mezcla semen:crioprotector y criopreservada. Se presenta la media \pm ES de % de formas normales (%N, *: p < 0.05 respecto de O, n = 3).

Si bien el shock hiperosmótico debido a una variación de más de 800 mOsm/kg tendería a disminuir el número de espermatozoides normales, es posible que exista un efecto sinérgico entre la osmolalidad elevada y el efecto del enfriamiento/estabilización a 37°C.

D.5.2- Viabilidad y Movimiento

Habíamos observado en experimentos previos, presentados en este trabajo de tesis, que cuando el espermatozoide inmerso en el PS (256-537 mOsm/kg), era forzado a salir a un medio de menor osmolaridad, debía regular su volumen por distintas vías, tales como un canal de K⁺. Cuando este canal era bloqueado, se observaron cambios en el patrón de movimiento espermático, resultando en una trayectoria mas herrática y lenta. Histológicamente se observaron cambios morfológicos a nivel del flagelo del espermatozoide. Si embargo, ni el estado acrosomal ni la respuesta a inductores fisiológicos se vieron afectados por el pretratamiento con el inhibidor del canal de K⁺.

La pregunta que surge a continuación es ¿qué sucedería si el espermatozoide se encontrara suspendido en un medio con una osmolalidad que oscilara entre 1000 y 2000 mOsm/kg y tuviera que migrar a un ambiente con 280 mOsm/kg?. Esta sería la situación que se presenta durante la utilización para tratamientos de asistencia reproductiva, de muestras de semen criopreservadas. Las muestras una vez descongeladas, de acuerdo con el protocolo de rutina, deberían ser procesadas para eliminar los crioprotectores y seleccionar los espermatozoides mótils, los cuales podrían utilizarse tanto para inseminación intrauterina o procedimiento *in vitro* (FIV o ICSI). Al utilizar como método de selección de los espermatozoides al Swim-up, los espermatozoides deberán nadar desde la suspensión semen:crioprotector, de osmolalidad de 1000-2000 mOsm/kg, hacia un medio de cultivo que generalmente presentan osmolalidades entre 280 y 300 mOsm/kg. Considerando que el gradiente es importante (alrededor de 800 mOsm/kg), se intentó disminuir la diferencia utilizando además un medio de una osmolalidad superior (400 mOsm/kg) y así evaluar si de este modo se recuperaban espermatozoides con mejores condiciones funcionales.

Además, en esta etapa se evaluó la participación de los canales de K⁺ sensibles a quinina. Para todo ello, se utilizaron espermatozoides criopreservados y descongelados luego a 37°C por el procedimiento estándar, a los que se seleccionó

mediante la técnica de Swim-up en medio de osmolalidad habitual (C o M280), otro de osmolalidad 400 mOsm/kg o a 280 mOsm/kg pero en presencia de Quinina, para evaluar la participación del canal de K⁺ sensible a Quinina.

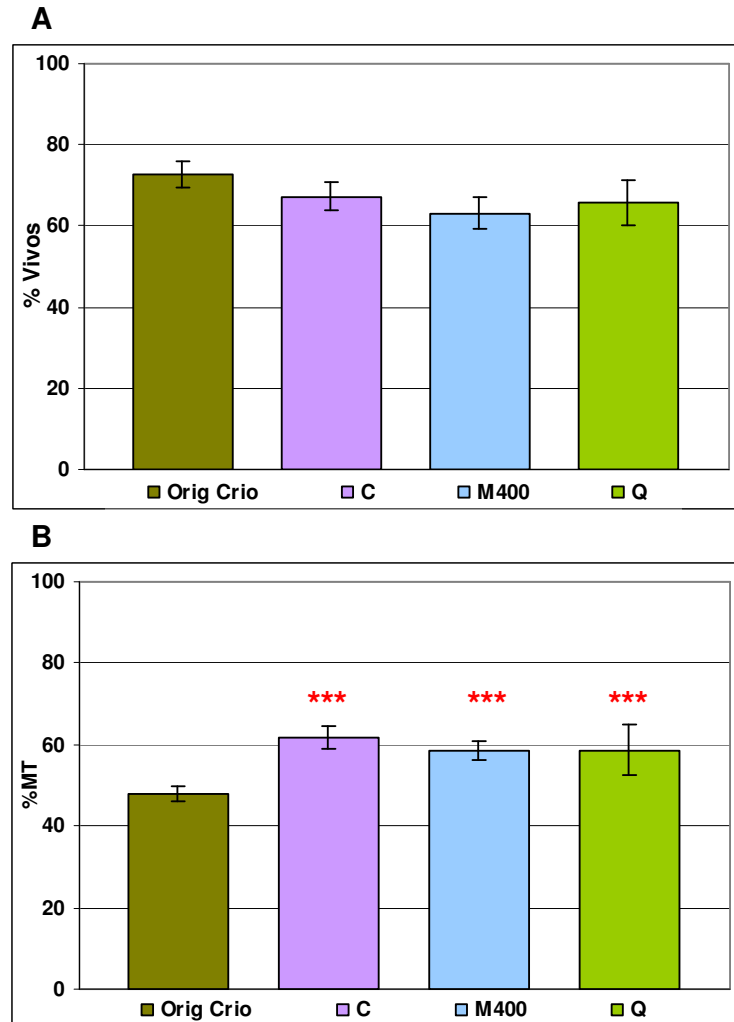


Figura 37: Efecto de la criopreservación sobre la Viabilidad y la Motilidad

Se usaron muestras de semen criopreservadas y descongeladas según protocolo habitual. Se recuperaron los espermatozoides móviles por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml, Control: C), en medio con osmolalidad ajustada con sacarosa (M400) y medio con inhibidor de canales (Q). Además se evaluaron las muestras recién descongeladas (Orig Crio). Se representa la media \pm ES en el Panel **A** de la viabilidad y en el **B** de los espermatozoides móviles totales (%Vivos y %MT, respectivamente ***: $p < 0.001$ respecto a Orig Crio, $n = 20$).

En las condiciones evaluadas se pudo determinar que la viabilidad no fue afectada para ninguna de los tratamientos. El % de espermatozoides móviles totales resultó, superior al de los espermatozoides de la muestra descongelada

original en todos los tratamientos (***: $p < 0.001$, **Figura 37**, Panel **B**), sin observarse diferencias entre tratamientos.

D.5.3- Cinética del movimiento

Se estudió el impacto del tratamiento de criopreservación sobre el movimiento mediante un análisis objetivo, evaluando los parámetros cinéticos que lo describen. Para ello se utilizó la metodología CASA, ya explicada en materiales y métodos sección 14.4., utilizando el **diseño experimental 5**.

En las condiciones evaluadas se pudo determinar que los espermatozoides recuperados post Swim-up, en todos los tratamientos presentaban trayectorias significativamente (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$) más progresivas, veloces y lineales respecto a los originales criopreservados y descongelados, como se puede apreciar en la **Figura 38** ($>VSL$, $> VAP$ y $> LIN$). No habiendo diferencias significativas entre los tratamientos propuestos y el control.

Previamente se había determinado que, en presencia de inhibidor (Q, **Figuras 30 y 31**) se generaba un cambio en el patrón de movimiento a expensas de la inhibición de los canales de K^+ por un movimiento menos progresivo ($< VSL$, $< VAP$ y $< LIN$) y menos lineal ($> ALH$) según se pudo apreciar en la **Figura 30**, efecto que se revertía mediante el lavado. Esto puso en evidencia que cuando el espermatozoide no tiene la capacidad de regular su volumen a través del intercambio de iones K^+ , su cinética de desplazamiento resulta menos veloz y menos lineal por el ingreso de agua, aumentando el ALH respecto de la trayectoria media. Al evaluar en esta etapa el efecto de la Quinina sobre los parámetros cinéticos que describen el movimiento de los espermatozoides, encontramos que no hay diferencias evidentes respecto de los controles. Aquí caben dos posibilidades, o el sistema está sobrepasado por una osmolalidad tan elevada (antes el gradiente evaluado era de alrededor de 100 mOsm/kg, mientras que aquí son de aproximadamente 800 mOsm/kg), o bien el canal ha sufrido alguna injuria por la criopreservación y ya no consigue ser bloqueado, por lo cual se presenta como si no fuese posible que actuara el inhibidor, o sea sin responder al reto hipoosmótico.

Estos datos nos sugirieron que, por un lado la utilización de medios de resuspensión hiperosmolales en donde el gradiente de osmolalidad sea menor, no mejora la calidad de los espermatozoides en cuanto a su movimiento y % de espermatozoides vivos y velocidades de desplazamiento respecto a los medios estandar de utilización comercial.

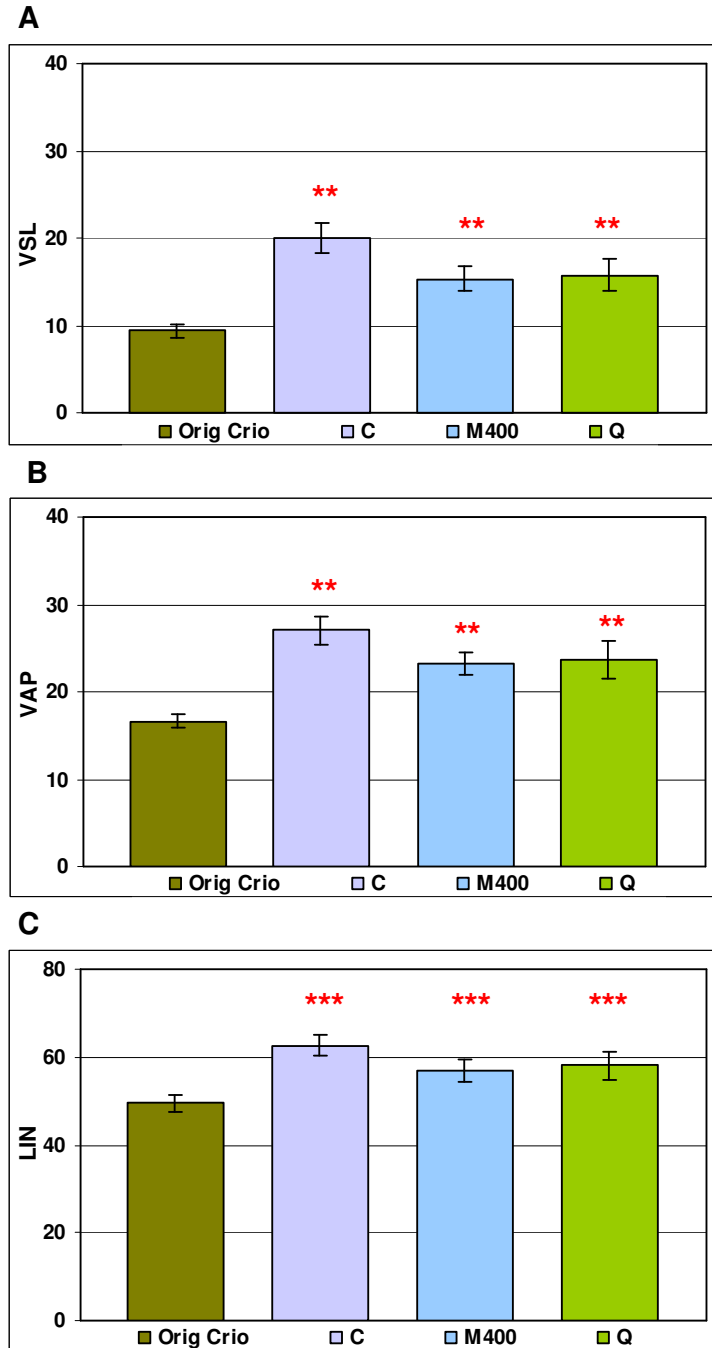


Figura 38: Parámetros cinéticos que describen las trayectorias de los espermatozoides descongelados y recuperados en distintas condiciones

Se usaron muestras de semen criopreservadas y descongeladas según protocolo habitual. Se recuperaron los espermatozoides móviles por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4mg/ml, C), en medio con osmolalidad ajustada con sacarosa (M400) y medio con inhibidor de canales (Q). Además se evaluaron las muestras recién descongeladas (Orig Crio). En los Paneles **A**, **B** y **C** se representa la media \pm ES de VSL, VAP y LIN respectivamente ($n = 20$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a Orig Crio).

Por el otro, había una coincidencia con lo presentado anteriormente cuando los espermatozoides fueron separados del PS en presencia del inhibidor de canales de K^+ sensible a Quinina, donde no se vió afectado el número de espermatozoides vivos, móviles ni de formas normales.

D.5.4- Morfología

Se estudiaron muestras criopreservadas y descongeladas mediante el diseño experimental descrito en material y métodos (**diseño experimental 5**) para evaluar el impacto de los tratamientos luego de la criopreservación, sobre la morfología.

En las condiciones evaluadas se pudo determinar que los espermatozoides recuperados (C, M400 y Q) presentaban anomalías en cabeza y en flagelo diferentes que para las muestra descongeladas (Orig Crio, **Figura 34**). Los porcentajes de cabezas anómalas resultaron inferiores, mientras que los porcentajes de anomalías de flagelo fueron superiores (**Figura 39**, Paneles **A** y **B** respectivamente, $n = 13$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). En estas condiciones, los resultados encontrados muestran que el tratamiento con Quinina no genera en el flagelo un efecto diferente que las otras condiciones, tal como se había descrito. Según se pudo observar previamente, al evaluar el efecto del inhibidor Quinina (**Figura 32**, Panel **B**) donde el % de anomalías de flagelo era mayor en presencia de inhibidor (Q) que para el control (C, $n = 21$; ** $p < 0.01$), lo que apoyaba la idea de que el inhibidor evitaba la capacidad del espermatozoide de regular el desequilibrio sacando K^+ , sufriendo un stress hipoosmótico que lo hace incluir agua a expensas de modificar la histología del flagelo. En este caso parece que algo similar ocurre para todas las condiciones, quizás por deterioro o inoperancia de los canales. Si bien no hay diferencias entre los tratamientos, se mueven con características cinéticas semejantes a las que presentaban los espermatozoides en fresco bloqueados con Q. Esto puede ser debido, quizás, a que se presentan modificaciones a nivel del flagelo, tan pronunciadas debido a la criopreservación, como en aquel caso. Los resultados harían pensar en canales dañados o inoperantes.

D.5.5- Reacción acrosomal

Considerando que el objetivo de la criopreservación es diferir la paternidad, y que el Swin-up es la técnica más ampliamente utilizada para remover el crioprotector, se procedió a estudiar el status acrosomal de los espermatozoides seleccionados.

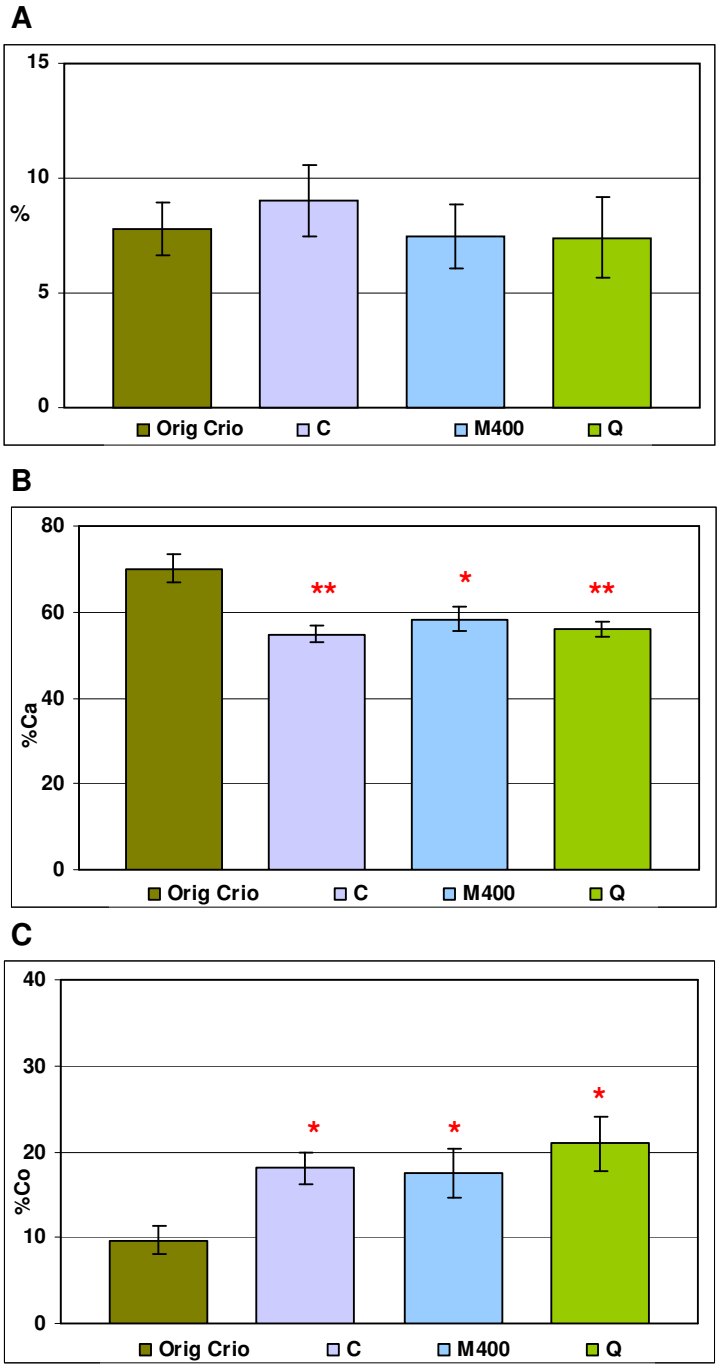


Figura 39: Efecto de la criopreservación en la morfología de los espermatozoides

Se usaron muestras de semen criopreservadas y descongeladas según protocolo habitual, recuperando los espermatozoides móviles por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml, C), en medio con osmolalidad ajustada con sacarosa (M400) y medio con inhibidor de canales (Q). Además se evaluaron las muestras recién descongeladas (Orig Crio). Se representa la media \pm ES de % de formas normales (%N) en el Panel A. En Panel B las anomalías de Cabeza y en el C las de flagelo (%Ca y %Co respectivamente, $n = 13$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto de Orig crio).

Una vez que se establecieron los efectos de las condiciones de recuperación de espermatozoides criopreservados sobre la viabilidad, el movimiento y la morfología, se procedió al estudio de la capacidad fecundante en las distintas condiciones de recuperación. Para ello se evaluó el estatus acrosomal de los espermatozoides criopreservados y descongelados mediante las técnicas y medios habituales de trabajo, según diseño establecido en materiales y métodos (**diseño experimental 5**). El estudio se enfocó a la RA espontánea o basal, con la finalidad de determinar si la elevada osmolalidad del medio crioprotector generaba una pérdida del contenido acrosomal, teniendo en cuenta las anomalías de cabeza observadas previamente (**Figura 34**). Para ello se evaluaron los distintos patrones de los espermatozoides reaccionados (SE, Parche y la suma de ambos o %RT).

Los datos muestran que, ya en la población basal el %RT es elevado respecto de lo que se esperaría en una muestra fresca (15-20%). Más aún cuando los espermatozoides criopreservados y descongelados son recuperados mediante un Swim up en presencia o no de Quinina, independientemente de las condiciones de resuspensión. En todas las condiciones evaluadas se observó tanto un aumento significativo en el %RT como en el %Parche (**Figura 40**, 46-69% y 37-55% respectivamente, $n = 13$, *** $p < 0.001$). Lo que hace pensar que si bien el tratamiento de criopreservación genera pérdida del acrosoma, es amplificado al separar los espermatozoides de la mezcla con crioprotector, pasando a medios de osmolalidades menores, lo que se debe probablemente a la exposición a un nuevo reto osmótico. Por lo que se puede apreciar, el canal sensible a Quinina parecería no regular, no funcionar luego de procedimientos tan extremos. Esta idea surge como consecuencia del análisis de los datos obtenidos, en estas condiciones, los cuales resultaron semejantes a cuando se trabajó previamente con muestras frescas bloqueando con Quinina.

Anteriormente, se presentaron los valores de viabilidad y motilidad de las muestras criopreservadas y los recuperados en las diferentes condiciones. Allí se pudo apreciar que el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras originales no eran diferentes de los recuperados en ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 36**, Panel **A**). Además, estos espermatozoides vivos presentaban movimiento (en todas las condiciones evaluadas, el % Vivos fue de alrededor del 60% y el %MT fue aproximadamente ese valor. **Figura 36**, Paneles **A** y **B**). Por lo cual no se puede pensar que el %RT sea por muerte de los espermatozoides, sino que además están

reaccionados en su mayoría (alrededor del 60% para todas las condiciones) y estos valores superan a los obtenidos para espermatozoides capacitados y expuestos a un inductor fisiológico como el FF.

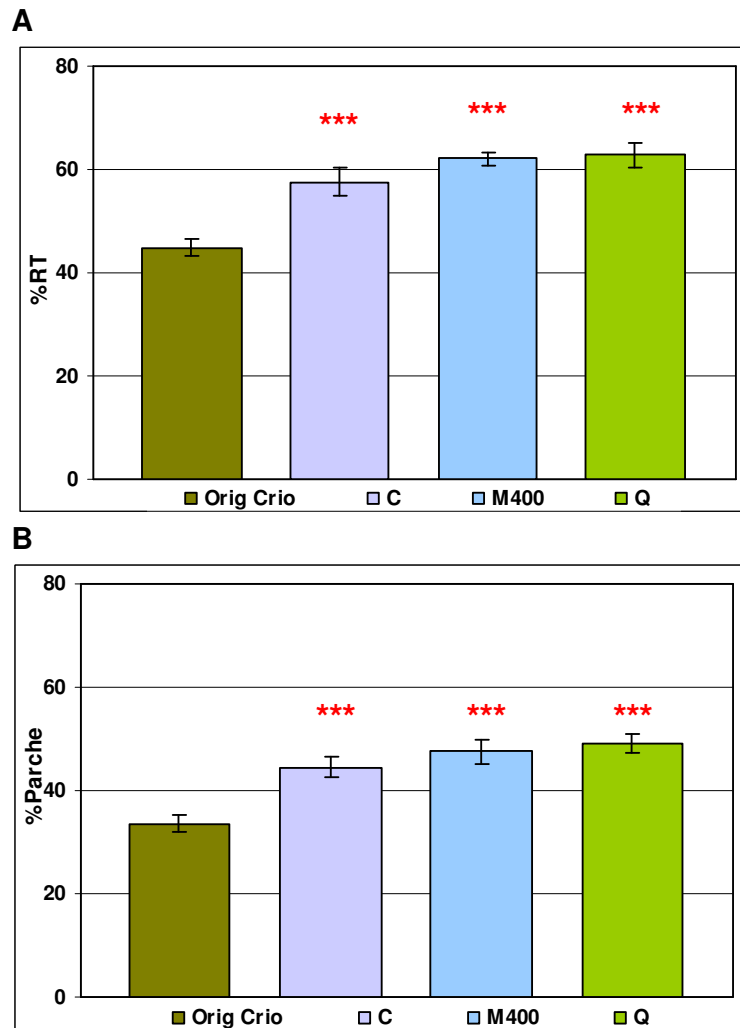


Figura 40: Efecto de la criopreservación en la reacción acrosomal de los espermatozoides descongelados

Se usaron muestras de semen criopreservadas y descongeladas según protocolo habitual, recuperando luego los espermatozoides móviles por Swim-up (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml, Control: C), en medio con osmolalidad ajustada con sacarosa (M400) y medio con inhibidor de canales (Q). Además se evaluaron las muestras recién descongeladas (Orig Crio). Se representa la media \pm ES de RA en los diferentes medios mediante %RT y % patrón Parche (Paneles **A** y **B** respectivamente, $n = 13$, *** $p < 0,001$ respecto de Orig Crio).

Solo quedan intactos el 40% de los espermatozoides que no han muerto durante el procedimiento. Esto es bastante crítico si se piensa en la población con chances de fecundar y esto es consecuencia del protocolo mismo de criopreservación/descongelamiento.

Podemos resumir que la injuria sobre las membranas de los espermatozoides afectaría la viabilidad, la motilidad, y todos los procesos asociados a la fecundación.

D.6- Recuperación seminal de pacientes en tratamiento oncológico

Si bien nuestros resultados mostraban que una gran cohorte de espermatozoides (60%) resultaban dañados durante el proceso de criopreservación/descongelamiento, la criopreservación de semen es una medida precautoria recomendable en los pacientes que transitan un proceso oncológico y deben recibir tratamientos gonadotóxicos. Sin embargo esta práctica no ha llegado actualmente a muchos servicios asistenciales y menos en la esfera pública. Nuestro objetivo siguiente fue evaluar el futuro reproductivo de los pacientes expuestos a tratamientos oncológicos por un período de seguimiento de 1 a 3 años.

D.6.1- Calidad seminal según tiempo post tratamiento oncológico

Se evaluó además la recuperación de la calidad seminal de las muestras de los pacientes expuestos a los tratamientos antes detallados.

Los pacientes monitorizados consiguieron preservar alrededor de 3 muestras ($2,8 \pm 0,2$ muestras, CI95% 2,6-3,0), que se lograron criopreservar en aproximadamente 12 viales por paciente (CI95% 11,4-12,6). Estas muestras presentaron, en general, una buena concentración media de espermatozoides progresivos ($18,9 \pm 3,3 \times 10^6$ esp.progresivos/vial, CI95% 11,9-26,0).

Luego de que los pacientes realizaron su tratamiento para la patología de base se les hizo un control entre 12 a 36 meses luego de la criopreservación ($n = 28$). Se evaluó el volumen, la concentración de espermatozoides en el eyaculado, el movimiento progresivo y los parámetros que describen el movimiento objetivo.

Como se puede observar en la **Figura 41**, Panel **A**, el volumen seminal en las muestras de los pacientes oncológicos evaluados, se mantuvo dentro de los valores normales establecidos por la OMS (1999, 2010), durante el seguimiento en el tiempo, hasta los tres años post finalizado el tratamiento. Lo mismo ocurrió con los valores de la concentración y del % de espermatozoides progresivos (**Figura 41**, Paneles **B y C** respectivamente). Los valores cinéticos del movimiento descripto por la velocidad de camino medio (VAP, **Figura 41**, Panel **D**) se mantuvieron en valores aceptables.

Esto estaría sugiriendo que tan sólo un año luego de haber criopreservado las muestras y recibido tratamiento específico, las variables seminales analizadas mostraron valores no diferentes a las iniciales.

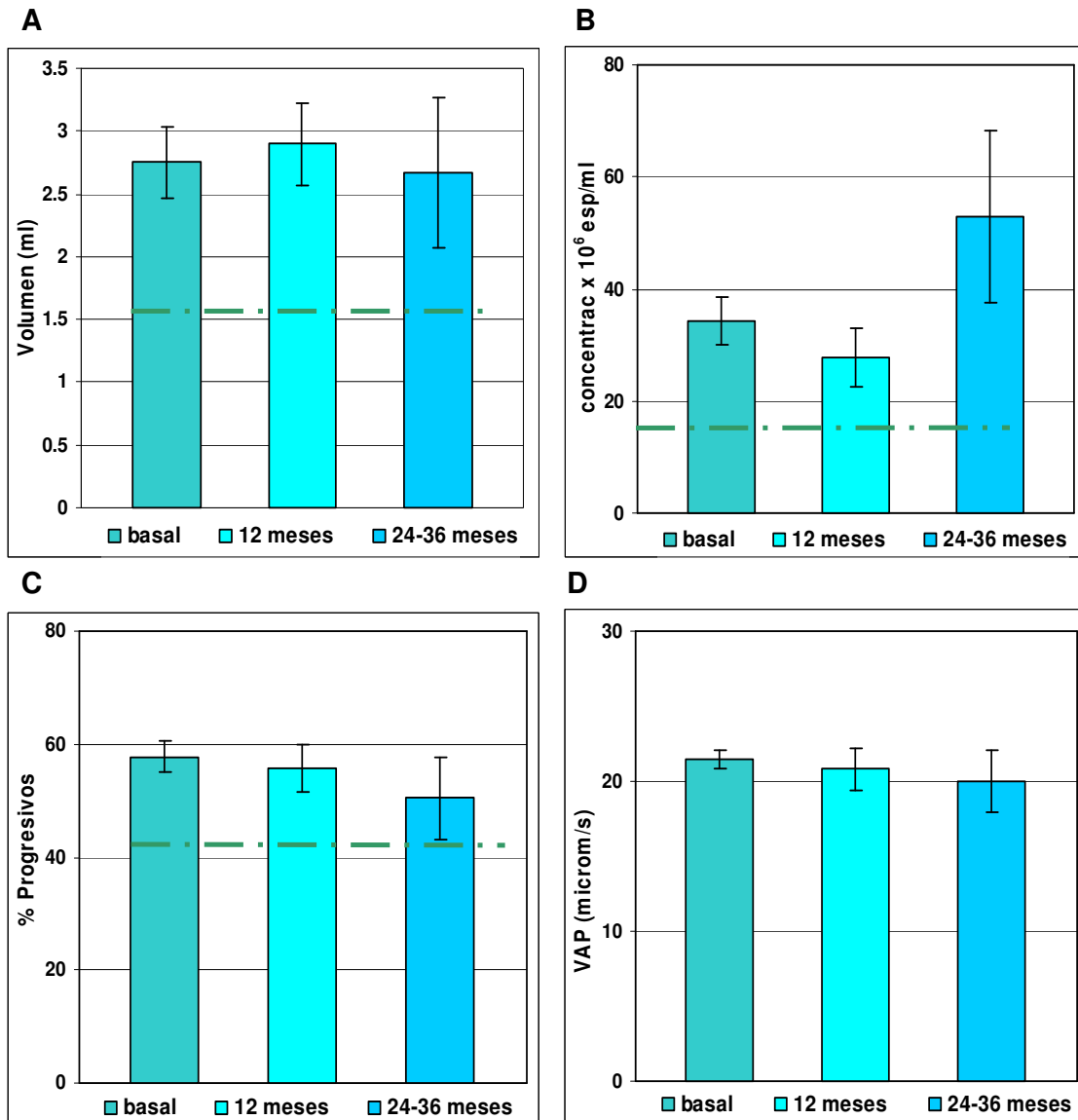


Figura 41: Calidad seminal según el tiempo transcurrido post tratamiento oncológico.

Se estudiaron las muestras de semen de pacientes expuestos a tratamientos gonadotóxicos, una vez terminado el tratamiento, durante 3 años. Se expresa el tiempo en meses, y se evaluaron el volumen de muestra en ml, la concentración espermática en esp/ml, el movimiento según % de espermatozoides con movimiento progresivo y la velocidad de camino medio (VAP en $\mu\text{m/s}$) (para basal $n = 28$; para 12 meses $n = 24$ y para 24-36 meses $n = 12$). - - - Valores de corte para Normalidad (OMS 1999, 2009).

Es de destacar que por protocolo se les sugiere a los pacientes, la re-evaluación mediante análisis seminal al año de haber criopreservado sus muestras, pero en algunos casos los pacientes no concurren a esta cita, lo cual lleva a un mayor el tiempo de re-evaluación o prefieren conservar un año más las muestras antes de descartarlas, y esto por lo cual los n a 24-36 meses es menor.

El 96% de los pacientes estudiados, recuperó la producción espermática en menos de 3 años post tratamiento. Más de la mitad de los mismos (74%) alcanzó valores superiores a 20×10^6 esp./ml a los 12 meses post tratamiento. De los pacientes que manifestaron voluntad de paternidad (n = 6) lograron el embarazo en forma espontánea. Sólo un paciente permaneció azoospermico luego del tratamiento (radioterapia) y logró embarazo y nacido vivo a partir de un tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad que consistió en la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) con las muestras criopreservadas.

E.- DISCUSIÓN

La importancia de estudiar la osmolalidad

A medida que el espermatozoide recorre el tracto reproductivo masculino y femenino, sobrelleva una serie de procesos que modifican su función y lo preparan para adquirir capacidad fecundante. Entre los cambios mas importantes se citan los relacionados con su membrana plasmática, la cual se modifica desde la espermatogénesis, hasta la fecundación. Es imprescindible que el espermatozoide logre atravesar y permanecer en los distintos ambientes, por donde transita, los cuales poseen una composición química variable. La importancia del estudio del ambiente extracelular se basa en su relación con: la modulación de la función espermática, la adquisición de la capacidad fecundante, la coordinación del transporte, la interacción con la superficie de las células epiteliales del tracto femenino, y la unión de ambos gametos.

La osmolalidad es una variable físico-química importante para el metabolismo intracelular ya que depende del tipo y concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos que conforman al fluido. Los fluidos biológicos, a los cuales el espermatozoide esta expuesto en su tránsito hacia el sitio de la fecundación, presentan una osmolalidad que varía en un rango importante (280 a 400 mOsm/kg). Por otro lado, durante el manejo de los espermatozoides *in vitro*, se utilizan medios de cultivo que deben respetar la osmolalidad fisiológica. Como consecuencia de estos cambios osmóticos, si el espermatozoide no es capaz de responder adecuadamente a estas variaciones, se podría afectar o modificar la función espermática, lo cual ha sido estudiado previamente por algunos autores (Bielfeld y col., 1993; Cañas, 2002; Yeung y col., 2005a,b). Se ha determinado que la regulación del volumen espermático está influenciada por el equilibrio del líquido a través de las membranas del espermatozoide. Una falla en este equilibrio podría derivar en una alteración en los mecanismos necesarios para la fecundación, ya que, entre otros, se modificarían las concentraciones intracelulares de iones y enzimas involucradas en dichos procesos (Cooper y Yeung, 2003; Fétic y col., 2006).

Durante la criopreservación, los espermatozoides son expuestos a soluciones hiperosmolales (> a 2000 mOsm/kg), con el fin someterlos a una deshidratación controlada previo al proceso de enfriamiento, para así preservar las características funcionales de la célula. Algunos estudios realizados en distintos modelos animales,

han evaluado la resistencia a la criopreservación y descongelamiento de los espermatozoides de distintas especies (humano, Chan y col., 1993; potro, Katila, 2001; mono, Rutllant y col., 2003; rata, Si y col., 2006; ratón, Cooper y col., 2008; monos, Correa y col., 2007; McCarthy y col., 2010).

Se ha propuesto a la osmosensibilidad como una característica funcional propia del espermatozoide tal como lo es la viabilidad, la integridad de las membranas, la motilidad y la capacidad de sobrellevar la reacción acrosomal (Aitken y col., 1983; Bielfeld y col., 1993; Caille, 1996; Cole y Meyers, 2010). Es por ello, que el objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar mediante un modelo *in vitro*, la asociación entre la osmolalidad del medio al que se exponen los espermatozoides humanos y la adquisición de su capacidad fecundante.

Osmolalidad de los distintos microambientes del tracto reproductivo masculino y femenino

Es importante destacar que todos los materiales biológicos evaluados en este estudio (secreción vaginal, moco cervical, fluido: folicular, oviductal, peritoneal y plasma seminal) provienen de pacientes que, no presentando patologías evidentes, se los ha encuadrado dentro de la “pseudonormalidad”. Esto debe ser tenido en cuenta ya que no es posible acceder a muestras biológicas de pacientes “normales” con fertilidad probada, debido a que no existiría justificación ética para la realización de las instrumentaciones necesarias para obtener los mencionados fluidos necesarios.

El primer punto a considerar, en este estudio, fue el análisis de la osmolalidad de los diferentes espacios por los que transita el espermatozoide durante su ascenso hacia el ovocito. Según se ha descrito, los valores de osmolalidad de los diferentes fluidos del tracto reproductivo femenino varían en un rango no muy amplio, tal como se resume en la tabla siguiente, construida a partir de los valores reportados en la literatura.

Comparativamente, nuestros datos muestran que los espermatozoides al ser eyaculados contactan con el plasma seminal (PS), ambiente con una osmolalidad de 358 ± 9 mOsm/kg (256 a 537 mOsm/kg) y que luego del coito comenzarían a migrar a través de ambientes de osmolalidad descendente en sentido PS-ámpula (358-269 mOsm/kg).

Fluido	Osmolalidad (mOsm/kg)	Especie	Ref.
Testículo	290-318	humano	1
	330-415	ratón	
Vaso deferente	340	humano	
Plasma seminal	300-330	humano	2
Moco Cervical	280-300	humano	2 y 3
Fluido Uterino	280-294	humano	4 y 5
Fluido folicular	300-340	humano	2

Ref.: Referencias. 1: Yeung y col, 2003; 2: Pilikian y Mimouni 1988; 3: Rossato y col., 1996; 4: Casslèn y Nilsson, 1984; 5: Lin y col., 1991.

En este estudio se determinó para la secreción vaginal y moco cervical valores medios de osmolalidad entre 313 y 362 mOsm/kg; mientras para el tubario y peritoneal valores medios menores entre 240 y 269 mOsm/kg respectivamente y 287 mOsm/kg para el fluido folicular, teniendo en cuenta que este último se mezcla con otras secreciones en el momento de la ovulación tales como fluido oviductal y peritoneal. Es así que se plantea en general un valor promedio de osmolalidad para el conjunto de secreciones presentes del tracto reproductivo femenino de entre 280-290 mOsm/kg, que coincide con los hallados por otros autores para todos los fluidos provenientes del tracto femenino (Casslèn y Nilsson, 1984; Rossato y col., 1996). El semen una vez licuefaccionado alcanza valores de 342 ± 2 mOsm/kg (Yeung y Cooper, 2001; Cooper y col., 2005b). Las diferencias observadas entre los valores de los distintos sémenes utilizados en este trabajo podrían deberse a la variabilidad intrínseca de las muestras biológicas, así como distintos los tiempos de evaluación post eyaculación. En el presente trabajo el tiempo de evaluación post eyaculación se estandarizó a una hora. En los fluidos biológicos pueden encontrarse presentes enzimas proteolíticas que modificarían los valores de osmolalidad por escisión de las moléculas proteicas. En nuestro caso se trabajó a los menores tiempos posibles de espera, manteniendo las muestras refrigeradas hasta el momento de medir la osmolalidad con la intención de disminuir la actividad enzimática.

El descenso en la osmolalidad durante el pasaje de los espermatozoides por el tracto femenino, resultaría de alrededor de 80 mOsm/kg, y llevaría a que el espermatozoide se enfrente a un stress hipoosmótico. Frente a este desafío

fisiológico el espermatozoide respondería regulando su volumen, lo cual confirmaría su tolerancia osmótica.

Tiempo de exposición al PS

El semen una vez eyaculado se convierte en un coágulo mas o menos consistente, que se licuefaciona entre los 5 y los 20 min aproximadamente. En el primer proceso participa el fluido que aportan las vesículas seminales, mientras que la disolución del coágulo es debida a las secreciones de la próstata y/o de las glándulas de Cowper. Se ha propuesto para la coagulación un sistema semejante al de la sangre, siendo la tromboplastina de origen prostático y la proteína coagulada una "fibrina seminal". Por otro lado el semen contiene enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de licuefacción del coágulo. Entre las enzimas se puede citar al pepsinógeno, activador del plasminógeno (que es parte del sistema fibrinolítico y de origen prostático, glándulas de Cowper y uretra terminal) y una proteinasa neutra denominada seminina o enzima tipo-quimotripsina con el mismo origen (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Se han descrito otras enzimas que participarían en la licuefacción del coágulo, como son lisozima, α -quimotripsina, dornasa pancreática, hialuronidasa y α -amilasa. Además, en la disolución del coágulo tanto *in vivo* como *in vitro*, participan el pH, la temperatura y otras enzimas de transudación presentes en la secreción vaginal. En el semen existen además inhibidores de las proteinasas como α -antitripsina y α -antiquimotripsina, entre otras, que modulan la actividad de las anteriores (Tauber y col., 1976).

Según describen algunos autores, la osmolalidad del semen varía con la temperatura y el tiempo post eyaculación, debido a la acción de sus propias enzimas hidrolíticas (Geigy, 1981, Yeung y col., 2003), obteniendo valores que se aproximan a la osmolalidad de los fluidos del tracto femenino: a los 30 min se obtienen valores de 289 a 351 mOsm/kg (Yeung y col., 2003).

Con la finalidad de confirmar si la osmolalidad del plasma seminal varía con el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su procesamiento, en este trabajo se evaluó en este trabajo, la osmolalidad a diferentes tiempos post eyaculación (10, 20, 30 y 60 min). Nuestros datos mostraron que la osmolalidad del plasma seminal a los 10 min de eyaculado varió entre 201 y 352 mOsm/kg, aumentando significativamente respecto del valor basal ($p < 0.001$), a partir de los 20 min post eyaculación (218 a 360 mOsm/kg), llegando a los 60 min a valores entre

257 y 537 mOsm/kg. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Geigy, respecto a que la osmolalidad aumenta con el tiempo (Geigy, 1981), aunque en ese trabajo previo se presentaban tiempos mayores, las determinaciones evaluaciones se realizaron cada hora hasta llegar a un total de 6 h post eyaculación. En el presente trabajo se ha determinado que el aumento es significativo a partir de los 20 min, lo cual concuerda con lo presentado por Cooper (Cooper y col., 2005) quienes describen que la osmolalidad del semen totalmente licuefaccionado aumenta significativamente a los 30 min post eyaculación (280 a 330 mOsm/kg) respecto de un tiempo basal de 5 min (269 a 311 mOsm/kg). Estos autores han trabajado con una o más muestras seminales de 15 voluntarios, 8 de los cuales eran normozoospermicas. En nuestro estudio solo se evaluó una muestra por cada uno de los 28 donantes, los cuales todos eran normozoospermicos (OMS, 1999). Si bien este estricto criterio de inclusión no nos garantiza que nuestras muestras representen valores que describan la población fértil, nos asegura una calidad mínima en cuanto a las variables seminales. Los resultados confirman lo descrito sobre la acción de distintas enzimas, con carácter hidrolítico y proteolítico, que al actuar sobre macromoléculas presentes en el plasma seminal, generan mayor cantidad de moléculas osmóticamente activas. Al aumentar la cantidad de moléculas osmóticamente activas, aumenta en consecuencia su osmolalidad, lo que se asocia al tiempo post eyaculación. Teniendo en cuenta la gran variabilidad en los valores de osmolalidad registrados y su aumento con el tiempo transcurrido luego de la recolección, la OMS ha propuesto en sus distintas ediciones estandarizar los métodos de recolección y el tiempo máximo aceptable post eyaculación para la evaluación, a 60 min entre la recolección y la evaluación de la muestra de semen con fines clínicos (OMS 1982, 1999, 2011).

Es importante destacar que la calidad espermática en los casos de reproducción asistida no siempre es óptima, lo cual podría hacer a los espermatozoides más susceptibles a los cambios osmóticos a medida que transcurre el tiempo. Como se pudo observar en la práctica, el valor de osmolalidad no varía por igual en todos los pacientes. Si bien los espermatozoides están preparados para enfrentar desafíos osmóticos, en aquellos casos donde la estructura de membrana plasmática se encuentre deteriorada, podría ser perjudicial al generarse un daño funcional. Muchas de las técnicas de reproducción asistida (inseminación intrauterina, fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática) implican la

separación del plasma seminal y la recuperación de espermatozoides móviles para ser inseminados. Teniendo en cuenta los resultados presentados en este trabajo, la osmolalidad del plasma seminal licuefaccionado podría resultar superior (≈ 350 mOsm/kg) a la que presentan los medios de cultivo comerciales (280 mOsm/kg). Por lo tanto, el espermatozoide se verá expuesto a un cambio osmótico y deberá regular su volumen para responder al cambio en la osmolalidad (shock hipoosmótico?), mediante el ingreso de agua o intercambio iónico a través de canales tales como Na^+ , K^+ , Cl^- . Cuando el espermatozoide no es capaz de responder mediante su capacidad regulatoria, o esta es superada, se generaría una modificación en la función espermática, lo cual podría malograr la fecundación del ovocito. Estos mecanismos de regulación se vinculan con el gasto de ATP y la modificación de concentraciones intracitoplasmáticas de enzimas e iones correspondientes.

Es por esto que se sugiere, acordando con otros autores (Björndhal y Kvist, 2003; Yavas y Selub, 2004; Cooper y col., 2005), disminuir los tiempos entre la obtención de la muestra seminal y su procesamiento, en los casos donde se vayan a realizar espermogramas o durante el manejo en reproducción asistida, no excediendo los 20 minutos para iniciar el procedimiento. Yavas y Selub determinaron que el intervalo de tiempo que mayor incide en el resultado de la inseminación intrauterina (IIU) es el que transcurre entre recolección de la muestra de semen y la separación del plasma seminal. Ellos han determinado que, cuando la espera para la separación del plasma seminal superando los 60 min y el tiempo total desde la obtención del semen hasta la transferencia de los espermatozoides supera los 90 min, disminuye la probabilidad de embarazo a 0 (Yavas y Selub, 2004). Esto pone de manifiesto nuevamente como un evento temprano compromete el resultado final, el cual, en este caso es el embarazo. Es probable que la acción de moléculas que aparecen durante la escisión proteolítica, así como la acción prolongada a factores decapacitantes y especies reactivas de oxígeno, presentes en el semen, produzcan consecuencias no deseadas (iatrogenia?) durante el manejo prolongado *in vitro*. Esto es un alerta ya que el tiempo de espera de 1 h a veces es necesario para obtener un semen licuefaccionado, apto para el manejo *in vitro*. Frente a los resultados obtenidos y al tiempo propuesto por otros autores, en aquellos casos donde no se consigue la licuefacción, podrían tomarse alternativas mecánicas (como ser pasajes suaves a través de jeringas de tuberculina).

Una vez que se estableció que durante su paso hacia el ovocito el espermatozoide debe enfrentarse naturalmente a cambios de osmolalidad de los distintos ambiente por los que transita y teniendo en cuenta que deberá regular su volumen frente a dicha variación, se continuó con el estudio de la función espermática en diferentes condiciones de osmolalidad, que remedan valores fisiológicos (280 a 400 mOsm/kg). Los espermatozoides móviles recuperados mediante Swim-up (original), se resuspendieron en los medios con las osmolalidades indicadas e incubaron 6 y 20 h en condiciones de capacitación y se evaluaron en cada caso los parámetros indicadores de función espermática ya descritos.

Osmolalidad, Viabilidad y Movimiento Subjetivo

Para evaluar la acción de la osmolalidad sobre la función espermática fue menester en primer lugar evaluar si las condiciones estudiadas eran deletéreas o tóxicas para los espermatozoides. Con esta finalidad se evaluó la viabilidad y el movimiento de los espermatozoides en las diferentes condiciones de trabajo.

Algunos autores han postulado que solo los espermatozoides funcionalmente óptimos no verían alterada su viabilidad y motilidad al exponerse a fluidos con osmolalidades en un rango entre 250 y 500 mOsm/kg (Lin y col., 1991; Yeung y col., 2003), asociando la osmosensibilidad con la calidad espermática. Además se ha determinado que existe una relación entre el tamaño de los espermatozoides y la cinemática de su movimiento (Yeung y col., 2003; Fétic y col., 2006). Las osmolalidades descritas por los autores citados, se encuentran dentro de los rangos de osmolalidades de ambos tractos (femenino y masculino) y del plasma seminal. En el presente estudio las osmolalidades evaluadas se encontraban dentro de este rango fisiológico (280 a 400 mOsm/kg), siendo todas las muestras de semen evaluadas, normozoospermicas según OMS (1999).

Las condiciones de osmolalidad utilizadas en este trabajo, no afectaron ni la viabilidad ni el movimiento de los espermatozoides, al menos durante los períodos elegidos de incubación *in vitro*. En cuanto a la viabilidad, los valores se mantuvieron comparables a los controles, para todas las condiciones evaluadas, entre el 85 y el 95% de células vivas, tanto a las 6 como a las 20 h de incubación. Esto coincide con el trabajo de Liu donde alrededor del 90% de los espermatozoides permanecen vivos al ser incubados 2 h en medios con osmolalidad dentro de los rangos de este trabajo (Liu y col., 2006). Respecto a la motilidad, a las 6 h de incubación al menos el 50%

de los espermatozoides presentaban un movimiento progresivo (Grado II + III), manteniéndolo mas del 40% de los espermatozoides aún a las 20 h de incubación, en todas las condiciones evaluadas. Estos valores coinciden con lo expuesto en los trabajos de Yeung ($65 \pm 3\%$), de Fétic ($49 \pm 3\%$) y de Liu (40-70%) (Yeung y col., 2003; Fétic y col., 2006; Liu y col., 2006), si bien todos trabajaron a tiempos de incubación menores, utilizando medios que remedan la osmolalidad del Moco Cervical (290 mOsm/kg). En los trabajos citados se utilizó NaCl, para modificar la osmolalidad, lo cual aporta dos iones (Na^+ y Cl^-) que participan activamente en la regulación del equilibrio a través de las membranas biológicas. En el presente trabajo se utilizó sacarosa para modificar la osmolalidad ya que, previamente se estableció que este azúcar no es utilizado por el espermatozoide para su metabolismo y no aporta iones que modifiquen el equilibrio (Caille, 1996). Luego de la separación de los espermatozoides móviles mediante Swim-up, los tiempos de incubación elegidos en este trabajo fueron de 6 y 20 h, mientras que los autores citados trabajaron a tiempos menores (90 min y 2 h como máximo) utilizando para la separación del plasma seminal la centrifugación. Sin embargo, a pesar de que la metodología resultara algo diferente los resultados fueron similares.

Nuestros datos sostienen que los espermatozoides humanos permanecen viables y con movimiento progresivo al ser incubados en medios con osmolalidades dentro del rango estudiado.

Osmolalidad y Fosforilación en Residuos Tirosina

Nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar si durante la incubación en los distintos medios elegidos (280 a 400 mOsm/kg) tenía lugar el proceso de capacitación espermática. La detección del patrón de fosforilación de proteínas en residuos tirosina es un estimador del estado de capacitación espermática, ya que se encuentra relacionada con la activación de sistemas quinasa que actúan en la fosforilación de algunas proteínas (Visconti, 1995a,b; Naz, 1996). Este es un proceso reversible que ocurre durante la incubación bajo condiciones capacitantes de los espermatozoides humanos.

Una vez descartada la acción deletérea de la osmolalidad sobre la viabilidad y el movimiento progresivo de los espermatozoides durante la incubación, se estudió si la osmolalidad modificaba el patrón de fosforilación de proteínas en residuos tirosina, asociado a la capacitación espermática.

Bajo las condiciones experimentales analizadas, los datos sugieren que dentro del rango de osmolalidades evaluadas (280 a 400 mOsm/kg), la cascada de traducción de señales que lleva a la fosforilación de residuos en tirosina asociada al proceso de capacitación ocurre proporcionalmente a lo que ocurre en los espermatozoides que permanecieron incubados en los controles. Se observó la intensificación de algunas bandas preexistentes así como la aparición de otras, que variaron entre 77 y 170 kDa, al igual que lo describe Buffone para el caso de muestras normozoospémicas, luego de una incubación de 6 h (Buffone y col., 2005). Se observó, para las condiciones evaluadas, una mayor cantidad de bandas y de mayor intensidad, tales como para los espermatozoides capacitados en el medio control. En el trabajo de Liu, se describe para las 2 h de incubación un aumento significativo para la densidad de las bandas mayores de fosforilación (95 a 170 kDa), casi duplicándose en aquellos espermatozoides incubados en el medio de 400 mOsm/kg (Liu y col., 2006). Este efecto podría deberse, como han postulado algunos autores, a una acción de remoción de factores decapacitantes por efecto de la hiperosmolalidad del medio, como son por ejemplo proteínas de la superficie del espermatozoide provenientes del plasma seminal como glicodelina-S entre otras (Aitken y col., 1983; Fraser, 1984; Sidhu y Guraya, 1989; Zaneveld y col., 1991; Bailey, 2010). En el presente trabajo se utilizaron tiempos de 6 y 20 h, si bien se determinó la intensificación y aumento de la cantidad de bandas, no se percibieron diferencias entre control y las condiciones de mayor osmolalidad. Esto indicaría que, disparada la cascada de reacciones que llevan a la fosforilación, una vez que el sistema ha respondido al máximo se mantiene el patrón e intensidad de la fosforilación.

El plasma seminal resulta ser una mezcla de fluidos al que aportados por la secreción de las glándulas anexas del varón (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Además de tener una función como vehículo de transporte de los espermatozoides, el plasma seminal posee moléculas que modifican la habilidad fecundante del espermatozoide para que esta no se manifieste prematuramente. Según describe Tomes en su trabajo (Tomes y col., 1998) en el plasma seminal se encuentran inhibidores de la fosforilación de proteínas en tirosina (además de inhibidores del movimiento, estabilizadores del acrosoma e inhibidores de las enzimas como son la ATPasa y la fosfolipasa A₂). La inhibición de la actividad tirosina quinasa y/o la activación de la actividad de la tirosina fosfatasa sería el mecanismo por el cual el plasma seminal

inhibe reversiblemente la fosforilación de las proteínas, efecto que se describe para espermatozoides incubados durante 5 u 8 h en condiciones capacitantes, y se evidencia debido a que el patrón de fosforilación vuelve a ser semejante al de los espermatozoides no capacitados (Tomes y col., 1998). En el presente estudio, confirmamos la reversibilidad en la detección del patrón de fosforilación mediante el uso de plasma seminal (20% v/v) luego de la capacitación. Al verificar la disminución en la intensidad y cantidad de bandas frente al tratamiento con plasma seminal, indicaría coincidencia con el proceso fisiológico adecuado.

Nuestros resultados sugerirían que en el rango de osmolalidad estudiado (280-400 mOsm/kg), la cascada de traducción de señales que se asocia al proceso de capacitación *in vitro* se desarrollaría adecuadamente.

Osmolalidad y Reacción Acrosomal

La RA, además de ser esencial para el paso de los espermatozoides a través de las cubiertas ovocitarias: células del cúmulo y zona pelúcida (ZP), es también un requisito indispensable para que el espermatozoide se fusione con la membrana plasmática del ovocito. La superficie del espermatozoide se encuentra cubierta por macromoléculas, en su mayoría de origen epididimario y del plasma seminal. Estas macromoléculas, protegen o estabilizan la membrana plasmática, previniendo que los espermatozoides experimenten una RA prematura mientras son transportados a través del tracto genital femenino. Durante el proceso de capacitación muchas de estas moléculas son removidas de la superficie del espermatozoide (Yanagimachi, 1981, 1994).

Una vez demostrado que en el rango de osmolalidad estudiado en este trabajo (280-400 mOsm/kg) ocurría la cascada que conduce a la fosforilación en residuos tirosina (asociada al proceso de capacitación) nuestro siguiente objetivo fue analizar lo que sucedía con la RA. Para ello se estudió la RA basal o espontánea y la RA inducida por un inductor fisiológico, como es el FF, en espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes, 6 y 20 h, a las osmolalidades de 280-400 mOsm/kg.

Nuestros resultados muestran que al incubar los espermatozoides por 6 h, no se percibieron diferencias en la RA espontánea o inducida entre los controles y las distintas condiciones de osmolalidad (% RT entre 22 y 35% tanto para basales como inducidos, para todas las condiciones estudiadas). Para este estudio se utilizó un

modelo donde la única condición que se modificó fue la osmolalidad con sacarosa. En este trabajo se observó, que a las 20 h de incubación el porcentaje de espermatozoides que perdieron espontáneamente el acrosoma aumentó a medida que lo hizo la osmolalidad del medio ($p < 0.001$: de 20 a 37% para basales), sin que se vieran afectadas ni la viabilidad ni la habilidad para capacitarse y responder a un estímulo fisiológico como es el FF. Esto indicaría que los espermatozoides capacitados 20 h (ON) en medio de 400 mOsm/kg, pierden espontáneamente su acrosoma en grado significativamente mayor que para el medio habitualmente utilizado durante en el manejo *in vitro* de los espermatozoides. Sin embargo, aún en estas condiciones (400 mOsm/kg) también responden al FF, en grado significativo respecto al no inducido ($p < 0.05$: de 38 a 46% luego de inducidos). Esto apoyaría la idea de que al removerse moléculas de la superficie se disparan otros mecanismos alternativos para la concreción de la RA, pero quedando aún sitios disponibles para la acción de la progesterona presente en el inductor fisiológico. Es posible que se estén activando mecanismos alternativos, debido a que, al modificarse el medio interno del espermatozoide en respuesta al equilibrio osmótico, se amplificaría la respuesta, resultando en un sinergismo entre la fracción que reacciona espontáneamente por el aumento de la osmolalidad mas lo que estimula el inductor. Como el aumento en la RA basal e inducida solo se evidencia a mayor tiempo de incubación (20 h y no a 6 h), podría indicar que el efecto de la osmolalidad sobre la RA es dependiente del tiempo de incubación en condiciones de capacitación. Es por esto que se apoya la idea de una remoción de moléculas, quizás relacionada con la fluidez de las membranas, la fusogeneidad, el citoesqueleto y equilibrio interno, que dispararían mecanismos alternativos amplificando la respuesta. Nuestro trabajo sugiere que se requiere un mayor tiempo de incubación en condiciones de mayor osmolalidad (340 y 400 mOsm/kg) para observar efecto de la variable estudiada (osmolalidad) sobre la RA, ya que cuando los espermatozoides son incubados a tiempos menores (6 h) no se observa efecto estimulante sobre la RA a causa del medio de incubación.

Lo observado hasta aquí, podría deberse a varios factores, por un lado la acción de remoción de moléculas (colesterol, otros lípidos y proteínas), mediante aceptores presentes en los fluidos tales como albúmina (presente en nuestros medios de incubación a 35 mg/ml). Toshimori describe que esto sería facilitado o amplificado a través de un mecanismo que, a pesar de no estar bien establecido,

podría involucrar una remodelación debido al intercambio de iones y agua (Toshimori, 2011). La remoción de moléculas cambiaría la fluidez y permeabilidad de las membranas, lo que a su vez se reflejaría en la modificación de eventos fisiológicos tal como influjo de iones que activan segundos mensajeros intracelulares como son adenilatociclasa, AMPc y proteína kinasa A (Petrunkina y col., 2004; Toshimori, 2011). Por otro lado, al cambiar la fusogeneisidad de las membranas y equilibrarse la célula, varía la concentración de iones y enzimas en el medio interno, modificándose el potencial de membrana, lo que actuaría directa o indirectamente sobre la cascada de eventos que llevan a la expresión de la RA (Petrunkina y col., 2004; Navarro y col., 2008). La hiperpolarización de la membrana, regula la habilidad del espermatozoide de incrementar el influjo de Ca^{++} durante la RA, involucrando aquí el rol de canales y segundos mensajeros (Bailey, 2010), lo que será retomado luego. A lo descrito por estos autores, consideramos que podría sumarse el hecho de que debido al equilibrio entre moléculas, se produzca una modificación de la distancia entre las membranas así como una acción sobre el citoesqueleto. Esta consideración responde al hecho que los iones intracelulares no se encuentran libres como en soluciones acuosas, sino que en general se encuentran involucrados en estructuras relacionadas con el citoesqueleto y con moléculas de anclaje a la membrana. Apoya esta idea la descripción de una sialoglicoproteína, equatorina, descrita como molécula de anclaje a las membranas acrosomales y asociada a la matriz acrosomal, formando complejos que actuarían diferencialmente en los distintos estadios de la RA, como ser la relocalización hacia el segmento ecuatorial (Toshimori, 2011). Además, se ha descrito en coincidencia con esta línea que, algunas modificaciones estructurales de las membranas, influyen en la acción de moléculas de señalización asociadas con la membrana o con el citoesqueleto subyacente, tal como canales iónicos, bombas o enzimas (Bailey, 2010).

La osmolalidad del plasma seminal aumenta con el tiempo post eyacuación, pero al estar presentes factores decapacitantes, se evitaría el comienzo del proceso de capacitación prematura. Al ser removido el plasma seminal, ya no pueden reponerse en la superficie del espermatozoide los factores decapacitantes, quedando solo aquellos que permanecen unidos, y bloquean sitios activos para la capacitación. Si el efecto disparador de la capacitación fuese solo debido a la osmolalidad elevada del plasma seminal, los factores decapacitantes presentes en el plasma seminal se estarían removiendo y a la vez reponiendo. Por lo tanto, es

evidente que los espermatozoides no pierden el acrosoma solo por permanecer en el plasma seminal, a pesar de la osmolalidad elevada. Coincidiendo con estas hipótesis, existe además en la bibliografía evidencia sobre la participación de la osmolalidad en la fisiología espermática, como es entre otros lo descrito por Aitken y Liu, quienes determinaron que en presencia de medios hiperosmolales (410 mOsm/kg) se estimulan, en los espermatozoides humanos, tanto la RA como la penetración de ovocitos de hámster, y se amplifica la capacidad de unión a la zona pelúcida (ZP) (Aitken y col., 1983; Liu y col., 2006). Cabe destacar que en el ensayo de penetración de ovocitos de hámster se trabaja con ovocitos sin ZP, los cuales son expuestos a espermatozoides capacitados. Un aumento en la cantidad de espermatozoides reaccionados se refleja en un aumento en la tasa de penetración ovocitaria ya que haber perdido el acrosoma es un requisito previo para la fusión de la membrana espermática con el oolema. Coincidiendo con nuestros resultados; ese trabajo muestra que, por un lado la hiperosmolalidad dispara la ocurrencia de la RA mientras que, por el otro aumenta el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. Es factible que la hiperosmolalidad también esté modificando de algún modo a la ZP del ovocito durante la coincubación en el medio hiperosmolal enmascarando la respuesta propia del espermatozoide, quizás al modificar la estructura tridimensional de la ZP. Otra explicación posible es que en los trabajos de Aitken y de Liu, han utilizado NaCl, lo cual agrega como variable la presencia de iones Na^+ y Cl^- que podrían estar modificando el equilibrio iónico intracelular. Los autores describen que si bien la osmolalidad podría amplificar la unión a la ZP por aumentar la unión a receptores, no amplificaría del mismo modo la respuesta a la inducción de la RA con ZP por evitar eventos posteriores dependientes del influjo de Ca^{++} . Cabe destacar que, a pesar de la independencia de los canales de K^+ y Cl^- , el movimiento de estos iones se encuentra acoplado por el potencial de membrana (Yeung y col., 2005a,b). La hiperpolarización de la membrana participa también en eventos de movimiento de iones, incluso intracelulares, así como en el aumento del pH interno necesario para el influjo de Ca^{++} .

A diferencia del trabajo de Liu (Liu y col., 2006), la osmolalidad en este trabajo fue modificada con sacarosa, azúcar que no participa en el metabolismo del espermatozoide humano, para evitar el agregado de variables al modelo propuesto. A pesar de la diferencia metodológica, nuestros resultados coinciden con Liu en atribuir a la osmolalidad, la disminución de la población inducible (PI que representa

a los espermatozoides que responden al inductor ya que se descuentan los reaccionados espontáneamente). Aunque ellos utilizan ZP como inductor, nosotros también determinamos en este trabajo que la osmolalidad *per se* origina la pérdida del acrosoma, con la consecuente disminución de la población inducible ($17 \pm 2\%$ para M280, $12 \pm 4\%$ para M340 y $9 \pm 2\%$ para M400). Históricamente se ha admitido que la población de espermatozoides con posibilidades de fecundar era aquella que mantenía intacto su acrosoma, por lo cual un aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados llevaba a suponer una menor chance de fecundación. En los últimos años se ha propuesto un mecanismo alternativo para la unión de los espermatozoides a la ZP y la inducción de la RA, utilizando espermatozoides de ratón, concluyendo que no es suficiente la unión a la ZP, sino que existiría una señal mecanosensoria, ya que encontraron espermatozoides que permanecen unidos a la ZP sin reaccionar (Baibakov y col., 2007). Por otro lado, recientemente se ha postulado que algunos espermatozoides podrían cursar la RA previamente a la unión a la ZP y una vez reaccionados penetrar la ZP y fecundar al ovocito. Estos resultados han sido analizados en espermatozoides de ratón, utilizando un modelo de fecundación *in vitro* en presencia del complejo cúmulo-ovocito intacto, observando la ocurrencia mayoritaria de la RA en el cúmulo oósforo (Jin y col., 2011). Estos autores, además evaluaron la ocurrencia de la RA mediante la capacitación *in vivo* y recuperación de espermatozoides del cúmulo, encontrando un gran número de espermatozoides (77%) que habían sobrellevado la RA en el cúmulo, sin encontrar espermatozoides intactos en la ZP, aunque si reaccionados (Jin y col., 2011). El cúmulo oósforo está bañado en FF que es un inductor fisiológico, siendo la principal molécula activa que dispara el influjo de Ca^{++} la progesterona (Blackmore y col., 1990 y Blackmore y Lanttazio, 1991). Si bien este precedente abre una nueva discusión al respecto, cabe destacar la diferencia de especie y el modelo utilizado con ratones doble transgénicos para que expresen una proteína fluorescente en acrosoma y otra en mitocondrias, y así poder evaluar la presencia de acrosoma mediante fluorescencia. Estos nuevos estudios estarían indicando que, aún una vez reaccionados, los espermatozoides tendrían posibilidades de interactuar con el ovocito.

El hecho de que, en nuestros experimentos, se observe que a medida que aumenta la osmolalidad aumenta el número de espermatozoides reaccionados espontáneamente, sumado a que la población inducible con patrón parche disminuye

significativamente, podría estar indicando que quizás sea ésta la población “en vías de reacción” la que accederá al ovocito, la cual se ve significativamente disminuida a mayores osmolalidades. Al evaluar los diferentes patrones de la RA para identificar la población que genera la diferencia en la PI (inducidos - espontáneos), se determinó que era aquella con patrón parche la que disminuyó en el medio de mayor osmolalidad ($p < 0.01$: de $6 \pm 2\%$ para M280 vs. 4 ± 1 y 1 ± 0.4 para M340 y M400 respectivamente). Se considera al patrón parche como el que representa a la población viable capacitada, que está en proceso de reaccionar, mientras el patrón de segmento ecuatorial lo presentan aquellos espermatozoides que han perdido el acrosoma completamente (Jaiswal y col., 1998; Jaiswal y col., 1999). El FF actúa como inductor principalmente por su contenido en progesterona y su modo de acción es a través de un receptor no genómico en el espermatozoide, definido recientemente como CatSperm (Publicover y col., 2007). Al ser incrementada la respuesta frente al inductor (FF) de la RA, en los medios de mayor osmolalidad, y siendo ésta la única variable modificada, podría indicar que los espermatozoides han reaccionado por efecto de la osmolalidad y no en respuesta al inductor. Por lo tanto, hay menos población que responde al inductor porque ya están en vías de reacción (mayor % con patrón parche) debido a la osmolalidad elevada (si ya estuvieran reaccionados sería SE). Algunos autores han descrito la participación de la osmolalidad describiendo que los medios hiperosmolales (500 a 600 mOsm/kg) serían inhibitorios de la RA, independientemente del inductor utilizado y si los espermatozoides están o no capacitados, mientras que medios hipoosmolales (160 a 190 mOsm/kg) inducirían la pérdida del acrosoma solo en espermatozoides capacitados (Aitken y col., 1983; Jeyendran y col., 1984; Bielfeld y col., 1993; Chan y col., 1993). En muchos de estos trabajos no se ha tenido en cuenta las diferencias entre RA completa o parcial debido a la metodología empleada, tal como lo refiere Jaiswal en sus trabajos (Jaiswal y col., 1998; Jaiswal y col., 1999). Además, las osmolalidades están fuera del rango de osmolalidades utilizadas en nuestro trabajo, ya que se trató, en esta primera etapa, de respetar los rangos fisiológicos de los espacios biológicos, así como los valores utilizados durante el manejo *in vitro* (280 a 400 mOsm/kg). Además en este trabajo determinamos que la respuesta a la osmolalidad elevada si depende del estado de capacitación ya que el efecto se evidenció recién a las 20 h de incubación y no a las 6 h.

Como ya se comentó, se están cuestionando algunos paradigmas, debido a que algunas evidencias experimentales han determinado que los espermatozoides aun reaccionados pueden unirse y penetrar la ZP, postulando mecanismos mas complejos de interacción con el ovocito (Baibakov y col., 2007; Jin y col., 2011; Reid y col., 2011). Si bien hoy día puede resultar controvertido el sitio exacto donde un espermatozoide sobrelleva la RA, se supone que una vez reaccionado de no tener chances de fecundar, morirá. Es por esto que nuestros datos aportan experiencia respecto del cuidado durante el manejo *in vitro*, ya que un aumento en la osmolalidad podría disminuir la cohorte con posibilidades de fecundar. Nuestros datos impulsarían estudios con fines de contraceptivos ya sea como acción alternativa o reforzando otros métodos conocidos como los de barrera o dispositivos intrauterinos.

De todas maneras se retomará este tema luego, cuando se discuta lo que ocurre cuando se exponen los espermatozoides a medios crioprotectores, los cuales presentan rangos de osmolalidades mucho más elevadas (2000 a 3000 mOsm/kg).

Bloqueo de Canales de K⁺ Sensibles a Quinina

El espermatozoide es una célula que prácticamente no presenta citoplasma, por lo que existe una relación importante entre superficie y volumen. Ante cambios osmóticos, se modifica la morfología de la célula, reflejándose en el espermatozoide humano, a nivel de cambios en el flagelo. Existe una estrecha relación entre la forma del espermatozoide y su desplazamiento en los diferentes fluidos, por lo cual un cambio en la forma podría incidir en su desplazamiento. El espermatozoide presenta una forma hidrodinámica, favorable a su objetivo que es ascender por el tracto reproductivo femenino. En todos estos eventos se encuentra involucrada la membrana plasmática del espermatozoide, ya sea mediante equilibrio iónico a través de ella o por la modificación de partículas adheridas o constitutivas, en menor o mayor grado. La respuesta del espermatozoide a los cambios en el medio que lo rodea se registra de diferentes modos y se relaciona con la fisiopatología espermática.

Nuestros datos muestran que a lo largo del tracto reproductivo femenino, el espermatozoide va a transitar espacios donde la osmolalidad de los fluidos es descendente, por lo que necesitará regular su volumen para no ser afectado por un shock hipoosmótico. La regulación del volumen espermático esta influenciado por el

equilibrio de moléculas osmóticamente activas, u osmolitos, a través de sus membranas (Inaba, 2003; Yeung y col., 2003; Petrunkina y col., 2004; Yeung y col., 2005b; Zhang y Gopalakrishnan, 2005; Barfield y col., 2006; Cooper y Barfield, 2006; Klein y col., 2006; Yeung y col., 2006). En los últimos años se han tratado de dilucidar los mecanismos fisiológicos de regulación del volumen espermático, mediante la utilización de canales iónicos, considerando que un defecto de los mismos explicarían parcialmente algunos aspectos de la infertilidad masculina (Yeung y col., 2002; Yeung y col., 2003; Petrunkina y col., 2004; Yeung y col., 2004; Yeung y col., 2005a,b; Zhang y Gopalakrishnan, 2005; Barfield y col., 2006; Klein y col., 2006). También se le asigna al proceso de criopreservación y recuperación posterior, un efecto disparador sobre los espermatozoides de muerte celular programada, a través de activación de caspasas, defecto en integridad de membranas y disminución de espermatozoides con potencial transmembrana mitocondrial intacto, entre otros (Paasch y col., 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, un defecto en la regulación del volumen espermático podría derivar en un daño permanente que conduzca a una falla en los procesos de capacitación y fecundación. Si el espermatozoide no tiene dicha capacidad regulatoria podría, en primera instancia, fallar en el traspaso del canal cervical. Si dicho efecto persiste, podría verse modificada o deteriorada la función espermática, debido a la variación en la concentración de diferentes moléculas intracelulares.

Se ha descrito al K^+ como responsable de la regulación del volumen espermático, a través de sus canales, presentes en la membrana del espermatozoide. Según Yeung, solo los espermatozoides viables son los que responden al bloqueo de estos canales (Yeung y col., 2003). En un trabajo reciente Navarro determinó que el aumento del pH intracelular activa dos canales iónicos, uno selectivo para Ca^{++} y otro para K^+ (CatSperm, receptor no genómico a progesterona, responsable del influjo de Ca^{++} asociado a hiperactivación, y KSperm responsable de la hiperpolarización de la membrana asociado a capacitación; Navarro y col., 2008). Además se ha localizado, trabajando con primates no humanos, dos dominios de poro de canal de K^+ a nivel de segmento ecuatorial y de pieza intermedia, involucrados en la RA y movimiento (Chow y col., 2007). Por otro lado, utilizando espermatozoides de cerdo, se ha descrito la necesidad de un citoesqueleto intacto para que el espermatozoide sea capaz de regular su volumen

adecuadamente durante la capacitación, lo que varía según el estado de capacitación, ya que los cambios en microfilamentos se relaciona con estadios tardíos de capacitación (superiores a 3 h), mientras que los cambios relacionados con microtúbulos con los iniciales (Inaba, 2003; Petrunkina y col., 2004; Correa y col., 2007).

Todos los canales de K^+ son miembros relacionados de una sola familia de proteínas. Sus secuencias de aminoácidos contienen un segmento altamente conservado, llamado secuencia de la firma TVGYG (Treonina, Valina, Glicina, Tirosina, Glicina). Esta secuencia forma un elemento estructural, el filtro de selectividad del canal de K^+ , lo cual los hace fácilmente reconocibles, y previene el paso de Na^+ , pero permite que los iones K^+ pasen a través de la membrana en circunstancias que se acerquen al límite de difusión (Ferrer Villada, 2004). Los miembros de la familia del canal de K^+ difieren entre sí principalmente, según el modo como están abiertos o bloqueados. El canal de K^+ es un tetrámero, formado por cuatro subunidades idénticas α , agrupadas alrededor de un poro central, dejando expuesta la porción β . Se muestran las distintas subunidades que rodean al poro, diferenciadas por color, en el interior del filtro de selectividad se encuentra el K^+ de color amarillo y en la **Figura 42** se puede observar el modelo de conducción del canal (Ferrer Villada, 2004).

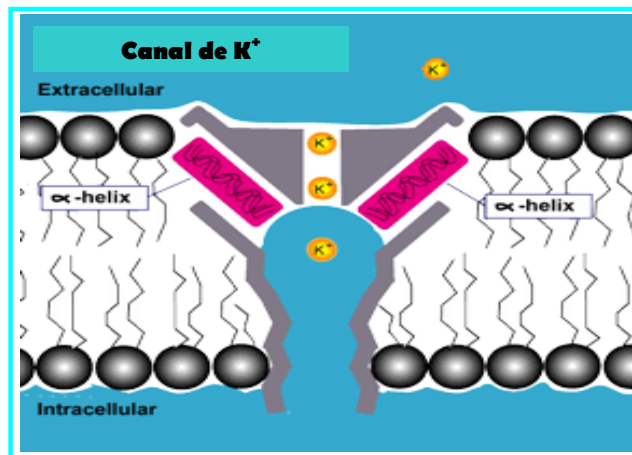


Figura 42: Esquema del canal de K^+ en la membrana celular. Se muestran la conducción del ión a través del canal y las porciones α hélice y el lago formado en el poro (modificado de Ferrer Villada, 2004)

El poro presenta una longitud de 45 Å con un diámetro variable a lo largo de éste. Este poro puede ser dividido en tres regiones, desde la parte interna: un túnel de 18 Å con paredes constituidas por hélices internas, una cavidad acuosa a mitad

de la membrana y una región más estrecha flanqueada por los filtros de selectividad que separan al poro de la solución extracelular (**Figura 42**). La cavidad acuosa se forma cuando un catión crea un campo electrostático que polariza su entorno, atrayendo los polos negativos de los dipolos hacia él. En una bicapa lipídica la polaridad es nula y por esto la energía del catión es muy alta, entonces para contrarrestar esta energía existe la cavidad acuosa. Las hélices se encuentran orientadas, de manera que el extremo amino (+) queda alejado de la cavidad, mientras que el extremo carboxilo (-) queda cercano a ésta, donde se aloja el catión. Este es el efecto hélice dipolo, y es otra estrategia para compensar la energía del catión en el interior de la membrana (Encinar Hidalgo, 1998; Ferrer Villada, 2004).

Una vez que se abre el canal, debe existir un mecanismo para cerrarlo, y el mecanismo más aceptado es el de “la cadena y la bola”. Según este modelo una compuerta del lado extracitoplasmático se cierra en ausencia de K^+ proveniente del exterior y la compuerta suelen ser los primeros residuos de aminoácidos de una subunidad α o β (o ambas). Un canal iónico se puede volver a abrir, por lo que el canal, al cerrarse, no forma ningún enlace covalente nuevo. El sistema de cerrar las compuertas está relacionado con el desfavorecer el flujo del ión en cierta dirección. Así pues, el papel asignado a las corrientes de K^+ es estabilizar el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio de Nernst para el K^+ , alejando el potencial del valor umbral de disparo del potencial de acción. Cuando la concentración del ión cambia, también ocurre un cambio en el potencial de Nernst para este ión, lo que genera un cambio conformacional. Numerosas toxinas, drogas y cationes orgánicos bloquean estos canales. En muchos casos ese bloqueo se debe a que dichas moléculas entran y se unen a algún sitio del poro, compitiendo con los iones permeantes por ocupar dicho sitio (Encinar Hidalgo, 1998)

Esto ocurre en los canales operados por voltaje y también en aquellos operados por ligando, donde la estructura es similar. La diferencia radica en que en vez de ser un cambio de potencial, lo que activa al canal es la presencia de una molécula. Esta molécula causa un cambio electroquímico, que sería equivalente al cambio conformacional realizado por el dipolo. Dentro de los posibles estados conformacionales fisiológicos de los canales están: cerrado, abierto e inactivo.

Con toda esta información, en esta serie de estudios se evaluó la participación de los canales de K^+ sensibles a Quinina, tal como el K Sperm recientemente descrito

(Navarro y col., 2008), durante la regulación del equilibrio osmótico en los espermatozoides humanos.

En primer lugar fue necesario establecer para nuestro modelo, la concentración adecuada de Quinina tal que no afectara la viabilidad ni la cantidad de espermatozoides móviles totales, este valor resulto de 62,5 μM , valor que había sido utilizado ya en la literatura consultada (Yeung y Cooper, 2001; Yeung y col., 2003; Fetic y col., 2006). Cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia del inhibidor selectivo del canal de K^+ (Quinina), se observó una modificación en el patrón del movimiento en comparación con los espermatozoides incubados en medio libre del inhibidor. Nuestros datos mostraron que en presencia de Quinina se observa una clara disminución de la velocidad (VSL y VAP, $p < 0.01$) y de la linealidad (LIN, $p < 0.01$; ALH, $p < 0.05$) sin que se afecte la viabilidad espermática ($> 90\%$). El cambio en el patrón de movimiento a expensas de la inhibición de los canales de K^+ se evidenció, al analizar las trayectorias, como un movimiento menos progresivo ($< \text{VSL}$, $< \text{VAP}$) y menos lineal ($< \text{LIN}$ y $> \text{ALH}$). Estos hallazgos coinciden con los estudios realizados por Yeung (Yeung y Cooper, 2001; Yeung y col., 2003), quienes trabajaron modificando la osmolalidad a valores de fluido uterino y moco cervical (290 mOsm/kg), utilizando diluciones u omitiendo el NaCl en los medios de cultivo y utilizando ionóforos del K^+ para evaluar la reversibilidad del efecto. A pesar de las diferencias en la metodología, los resultados obtenidos coinciden con que la falla o incapacidad en la regulación del volumen del espermatozoide, dependiente del canal de K^+ se manifiesta en un movimiento menos progresivo respecto a los controles.

Además se observó un aumento en el % de anomalías asociadas al flagelo (controles; $12 \pm 1\%$ y tratados con quinina: $18 \pm 1\%$ respectivamente, $p < 0.01$), lo cual se correlaciona con las dificultades de progresión observadas en el análisis cinético del movimiento. El hecho de que los espermatozoides enrollen su flagelo como consecuencia del ingreso de agua se debe quizás a que la membrana plasmática en la cola es más flexible y está menos unida a las estructuras subyacentes en comparación a las de la cabeza (Jeyendran y col. 1984). Este efecto ha sido utilizado en pruebas asociadas a la viabilidad espermática (prueba de HOS) ya que al ser tratados los espermatozoides con medios hipoosmolales (150 mOsm/kg) muestran distintos patrones de enrollamiento. Los patrones de modificaciones del flagelo y pieza media observados en este trabajo en presencia de inhibidores del canal de K^+ , fueron muy similares a los descritos por Jeyendran y

col., (1984) cuando los espermatozoides fueron tratados con medios hipoosmolales. En su trabajo, Yeung trató de establecer diferencias respecto de la forma de la cabeza del espermatozoide humano, tal como sucede en los espermatozoides de murino, pero no fue posible, aunque si evidenciaron engrosamiento a nivel de extremo del flagelo (Yeung y Cooper, 2001).

Por otro lado la presencia de Quinina no modificó el estado acrosomal de los espermatozoides ni su habilidad para responder a un inductor fisiológico como es el FF. La PI en todos los tratamientos estuvo por encima del 15%, valor sugerido como de buenas posibilidades de fecundación al utilizar como inductor al ionóforo de Ca^{++} (OMS, 1999; 2010). A pesar de considerar que la variación en el volumen podría modificar el medio interno de la célula y que la variación en la composición iónica intracelular podría afectar el proceso de capacitación necesario para que ocurra la RA, nuestros resultados no muestran efecto alguno sobre el curso de la capacitación y RA. Esto apoyaría la independencia del canal de K^+ sensible a Quinina, del influjo de Ca^{++} , asociado con la RA, tal como lo describe Yeung (Yeung y Cooper, 2001). También podría sugerirse un efecto transiente y/o reversible de la Quinina agregada, en este trabajo, solo durante el Swim-up inicial, la cual luego, durante la incubación de 20 h previa a la evaluación de la RA, podría verse diluida o inactivada. En esta etapa, se evaluó además si el bloqueo de los canales afectaba a la PI y si dicho efecto era reversible, o sea si cesaba al removerse el inhibidor. Nuestros datos muestran que las poblaciones que responden al inductor fisiológico no son afectadas por el inhibidor, por lo cual, al ser removido no se apreciaron diferencias.

Los resultados encontrados respecto de la no acción sobre la RA, llevaría a establecer las distintas hipótesis:

- La inhibición con Quinina afecta las etapas iniciales de la migración y traslado. La inhibición de la regulación del volumen mediado por canales de K^+ se revierte por lavado, indicando una unión no permanente por dilución o remoción.

- El efecto no es permanente, solo se establecería un bloqueo momentáneo del canal con disminución de los parámetros que describen la cinética del movimiento relacionado con las trayectorias. Este efecto no permanece en el tiempo, y el espermatozoide puede capacitarse y sobrellevar los mecanismos propios que derivan en la RA. Estos implican el influjo de Ca^{++} , respuesta a segundos mensajeros, o remodelación de las membranas, sin pérdida o modificación de capacidad fecundante, evaluada a través de la RA inducida. Es posible también

pensar en la posibilidad de aumentar, en estudios futuros, el número de casos estudiados, agregando otros bloqueantes.

Se pudo establecer que la acción inhibitoria (de Quinina sobre el canal de K^+) es reversible, sugiriendo una unión débil del inhibidor al espermatozoide, esto también coincide con los trabajos de Yeung, donde se utilizaron ionóforos de K^+ , luego de la inhibición del canal con Quinina (Yeung y Cooper, 2001).

Los canales de K^+ serían acuosos y, al ser expuestos a medios también acuosos, es factible observar un efecto de dilución del inhibidor, así como el desplazamiento de las moléculas de agua sobre los sitios ocupados por la Quinina. Además es posible que el efecto fuese transiente y que una vez inhibido el canal volviera a su estado de reposo. En este tipo de canales se postula la existencia de dos compuertas una extra y otra intracitoplasmática. La compuerta de activación del canal se abre con la despolarización (proceso conocido como activación) y con la repolarización de la membrana se cierra (desactivación). Por otro lado, la compuerta de inactivación se cierra con la despolarización (proceso conocido como inactivación) y se abre con la repolarización (recuperación de la inactivación). La inactivación del canal es el resultado de los cambios conformacionales en la región externa del poro. La Quinina es una aminoquinolina sustituida que prolonga la repolarización, generando así un mayor bloqueo a medida que se va despolarizando la membrana y bloquea preferencialmente los canales abiertos de Na^+ y K^+ , la molécula de Quinina accede a su sitio de unión en el lado intracelular de la membrana plasmática. La Quinina presenta en su estructura un único grupo amino terciario cuyo pKa es 8.6 y este átomo de N a pH fisiológico está predominantemente protonado, lo que hace pensar que el mismo podría establecer una interacción entre los electrones pi y el catión (pi-catiónica) con los residuos F656 y Y652 (Ferrer Villada, 2004). Se ha determinado que en algunos canales de K^+ los residuos F656 y Y652, presentes en el dominio intramembrana S6, que forman parte de la pared interna de la cavidad central de los canales, constituyen una parte importante del supuesto sitio de unión de Quinina al canal de K^+ . Luego de unirse al primer sitio, la molécula de Quinina se mueve a su segundo sitio de unión, pero como no está presente en la posición Y652 el residuo tirosina sino que hay una alanina, la Quinina no va a poder establecer interacciones pi-catiónicas con el grupo metilo de la alanina y el canal se va a desbloquear. Así el efecto bloqueante sería transiente.

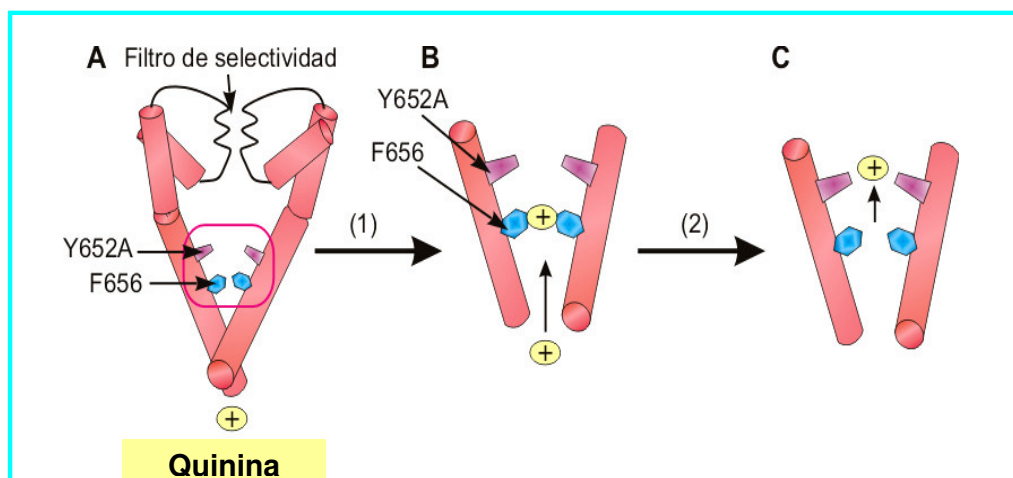


Figura 43. Esquema del modelo propuesto para la interacción de Quinina con el canal de K⁺ (modificado de Ferrer Villada, 2004).

En la **Figura 43** se presenta el modelo propuesto para la acción de la Quinina sobre los canales de K⁺. En el **Panel A**, se representa la cavidad interna del canal donde se muestran los residuos A652 y F656, con los cuales interaccionaría la Quinina. Cuando el canal está cerrado no hay interacción del fármaco con el canal. En los **Paneles B** y **C** se muestra ampliada la región que se encuentra inserta en un recuadro del **Panel A**. Se aprecia en el **Panel B** que al abrirse el canal, producto de una despolarización a potenciales cercanos al valor umbral de activación de la corriente (1 en el esquema), la Quinina interacciona con los residuos F656. Mientras que en el **Panel C**, cuando la despolarización es más fuerte (2 en el esquema), la Quinina se mueve a su segundo sitio de unión, pero como no está presente en la posición Y652 la tirosina sino que hay una alanina, la Quinina no va a poder establecer interacciones pi-catiónicas con el grupo metilo de la alanina y el canal se va a desbloquear (Ferrer Villada, 2004).

Al menos *in vitro*, los espermatozoides actúan como un osmómetro perfecto, utilizando al K⁺ para equilibrar su medio interno y regular su volumen al salir del plasma seminal. Cuando los espermatozoides son expuestos a un inhibidor de canales de K⁺, se observan cambios asociados al patrón de desplazamiento progresivo, sin modificación de la capacidad fecundante del mismo. Considerando que la motilidad progresiva es requisito necesario para que el espermatozoide se desplace y acceda al sitio de fecundación, la inhibición selectiva de canales específicos involucrados en la regulación del volumen espermático podría ser utilizado con fines contraceptivos. Si consideramos la posibilidad de su uso como

bloqueo para fines de contracepción consideramos que sería utilizable como complemento de algún método a nivel de canal cervical o útero ya que estaría impidiendo una normal migración. Es importante tener en cuenta que la respuesta fisiológica en la regulación del volumen espermático afecta a más de una molécula osmóticamente activa, y la relación de estos movimientos que involucran canales es terreno interesante para futuros estudios de anticoncepción.

Criopreservación como modelo de contacto con medio hiperosmolal

La capacidad de una célula para sobrevivir a la criopreservación/descongelamiento se asocia al tamaño celular, al estado de hidratación y a la permeabilidad de la membrana plasmática. Para que la célula se mantenga viable y en adecuadas condiciones respecto a su fisiología, durante el procedimiento de criopreservación, se recurre al uso de crioprotectores. La acción del crioprotector se puede explicar por su capacidad de formar puentes de H con el agua y alterar la normal estructura cristalina del hielo. Así, disminuye el punto de congelamiento de la solución y deshidrata a las células a criopresevar mediante un gradiente osmótico. Si el proceso de deshidratación no ha sido realizado en forma lenta, se forman, al exponerla a muy bajas temperaturas, cristales intracelulares que dañan a la célula. La membrana plasmática de las células posee permeabilidad variada a las moléculas de los compuestos utilizados en general como crioprotectores (Cooper y col., 2008). Entre los crioprotectores mas utilizados se pueden citar: los intracelulares o penetrantes con pesos moleculares < 100 como el 1,2 propanediol, metanol, etanol, glicerol, DMSO, etilenglicol; y los extracelulares con peso molecular alto como la sacarosa, proteínas o lipoproteínas. En general las osmolalidades de los crioprotectores son elevadas (2000 a 3000 mOsm/kg), por lo que se debe considerar que durante todo el proceso se establecen retos osmóticos, relacionados con la permeabilidad de la membrana plasmática de las células.

En el caso particular de las muestras de semen, este es un nuevo desafío frente a la respuesta obtenida a la criopreservación, ya que se trata de preservar al espermatozoide en su función fecundante. Para conseguir la preservación de la fertilidad masculina, se puede recurrir a la autoconservación de muestras de semen. Este procedimiento es aconsejable antes de una vasectomía, antes de comenzar tratamientos oncológicos, ante la exposición a trabajo riesgoso, como son por ejemplo: fuerzas militares en países que aceptan la procreación póstuma. También

resulta una alternativa en aquellos tratamientos por infertilidad, cuando se detecta una oligozoospermia severa, que puede empeorar en el tiempo, o presencia intermitente de espermatozoides en los eyaculados, ante la necesidad de recolección especial (eyaculación retrógrada o colección quirúrgica del tracto genital masculino). Es útil en aquellos pacientes que no pueden producir una muestra fresca el día del procedimiento (distancia), o en casos de donantes para dar el tiempo necesario de evaluar su estado de salud (hepatitis, HIV, entre otras). Por lo tanto, es fundamental determinar las características criobiológicas de los espermatozoides humanos.

Durante la criopreservación, en los espermatozoides, se induce un cambio hipertónico inicial debido a que el crioprotector desplaza agua desde el citosol; luego durante el descongelamiento el espermatozoide sobrelleva el proceso inverso o stress hipotónico ya que el agua fluye dentro de la célula para desplazar al crioprotector. Es sabido que también se da un stress oxidativo y mecánico durante la criopreservación, sin embargo en nuestro caso, elegimos simplemente evaluar solo el efecto del stress osmótico sobre los espermatozoides. Ambos procesos (stress osmótico y oxidativo) durante la criopreservación del semen, podrían contribuir al daño en la membrana y celular, lo cual podría conducir a reducción en la motilidad y viabilidad del post-descongelado.

Cuando los espermatozoides son descongelados y liberados del crioprotector recibe un nuevo shock hipoosmótico, ya que se los recupera en medios con osmolalidad de 280 mOsm/kg, la cual es muy inferior a la del medio crioprotector donde fueron almacenados. La osmolalidad entonces también ha sido asociada con los efectos deletéreos que se producirían en el espermatozoide durante la criopreservación, posiblemente como consecuencia de la variación en la concentración de los componentes intracelulares durante los procesos de congelamiento y descongelamiento (Watson y col., 1992; Chan y col., 1993; Gao y col., 1993; Noiles y col., 1993; Petrunkina y col., 2004). Se ha descrito que, durante la criopreservación, se dan cambios que dañan la función del espermatozoide, a nivel de proteínas (por ejemplo aumento de la expresión de las heat-shock 70 frente a stress osmótico). También se observa, una fase de transición de lípidos a ambos lados de la membrana plasmática, luego del procedimiento de enfriamiento, y dicho reordenamiento lleva a pérdida de la estabilidad de la bicapa lipídica con la exposición de fosfatidil serina en la superficie, asociada a las fases tempranas del

proceso de apoptosis (Martin y col., 2004; Cole y Meyers, 2010). Según describen algunos autores, los crioprotectores, además de su efecto protector, dispararían un mecanismo similar a la apoptosis, mediante la disipación del potencial transmembrana mitocondrial lo que lleva como consecuencia a su disfunción, y activación de la cascada de caspasas (Martin y col., 2004; Paasch y col., 2005). El glicocalis espermático es fundamental para la migración e interacción entre gametos y es susceptible de ser modificado por daños físicos durante la criopreservación, Talaei ha determinado un cambio en el patrón de glicoconjugados de superficie en espermatozoides humanos durante la criopreservación (Talaei y col., 2010).

Es posible que además se generen cambios conformacionales de poros o canales, ya que algunos poseen dominios acuosos y la deshidratación podría afectarlos profundamente evitando luego su recuperación funcional. Con el fin de evaluar la acción de la osmolalidad elevada sobre la recuperación de la función espermática, en este trabajo de tesis se realizaron estudios en muestras criopreservadas mediante protocolo de uso habitual.

Para ello, se estudió separadamente la posible injuria que podría afectar al espermatozoide y su función, evaluando en una primera instancia la acción de la mezcla del semen con la solución crioprotectora, *per se* y luego el efecto del crioprotector sumado a la disminución de la temperatura al ser conservada en N₂ líquido (-196°C). En las condiciones evaluadas se pudo determinar que la viabilidad no se vio afectada (> 70% en todas las condiciones) y que la deshidratación controlada que produce la exposición al crioprotector no se reflejaría en cambios a nivel morfológico, evidenciables microscópicamente, ya que no se observan diferencias significativas entre el % de formas normales en la muestra original, respecto al de los espermatozoides en contacto con el crioprotector (15 y 11% respectivamente). Sin embargo, cuando los espermatozoides expuestos al medio hiperosmolal de crioprotección, son conservados en N₂ líquido a -196°C y descongelados, el porcentaje de formas normales decae significativamente respecto al original (15% vs 6%, $p < 0.05$). Esto sugeriría que, en este caso, el aumento de la osmolalidad no sería *per se* la causa de la disminución del porcentaje de formas normales. Es posible que exista un efecto sinérgico entre la osmolalidad elevada y el efecto de la criopreservación/descongelamiento, quizás como consecuencia de un daño celular por la formación de cristales de hielo intra o extracelulares.

Al evaluar la ocurrencia de la RA espontánea, determinamos que en ambas situaciones el %RT fue superior al 60%, lo cual supera los valores observados durante inducción de la RA con inductores fisiológicos (suele incrementarse un 15% respecto de sus basales; en nuestro caso la RA inducida con FF en espermatozoides capacitados ON no superó el 50% en ningún caso). Al no determinarse diferencias en ambos esquemas experimentales, esto nos indicaría que el efecto podría estar evidenciado fundamentalmente por la acción de la osmolalidad elevada, que quizás estaría superando la capacidad regulatoria del espermatozoide. Como ya se expuso anteriormente, osmolalidades de 340 y 400 mOsm/kg inducían la RA en espermatozoides capacitados ON. En esta etapa confirmamos que la mezcla semen/crioprotector utilizada en este estudio, presentaba una osmolalidad de aproximadamente 1200 mOsm/kg. Nuevamente observamos que, sin deteriorar la viabilidad, la osmolalidad elevada estaría actuando en la prosecución de la RA, quizás por actuar a nivel de las membranas involucradas (plasmática y acrosomales interna y externa). Debemos recordar que están presentes los factores decapacitantes en la mezcla PS/crioprotector y quizás debido a esto al separar del medio mezcla aumenta aún mas la RA. Cabe destacar que al evaluar microscópicamente la RA, los espermatozoides que presentaron cabezas extremadamente hinchadas, mantenían en muchos casos sus acrosomas intactos, o presentaban los patrones normalmente descritos para la RA (parche y segmento ecuatorial).

Una vez que se determinó la acción sinérgica de la osmolalidad elevada del crioprotector y la criopreservación, se procedió a evaluar la participación de canales de K^+ sensibles a Quinina cuando los espermatozoides descongelados son liberados del crioprotector y deben moverse en un medio de osmolalidad mucho menor a la del medio de preservación (1200 a 280 mOsm/kg). Con la intención de observar beneficios o amortiguar el shock hipoosmótico que podrían sufrir los espermatozoides al ser recuperados en un medio de 280 mOsm/kg durante el descongelado y liberación del crioprotector, se incluyó la recuperación en un medio de 400 mOsm/kg, utilizando sacarosa para modificar la osmolalidad del medio ya que se ha demostrado que no afecta la función espermática.

En las condiciones evaluadas se pudo determinar que la viabilidad de los espermatozoides recuperados en los distintos medios, no se vio afectada (> 60% en todos los casos). El movimiento espermático también se recuperó adecuadamente

(%MT \approx 60% en todos los casos), para las condiciones estudiadas. Debido a la selección de espermatozoides móviles, mediante Swim-up, se observa un aumento significativo ($p < 0.001$) en el porcentaje de espermatozoides móviles en los recuperados. No se observaron diferencias entre los tratamientos entre sí, y no se identificó el efecto del inhibidor Quinina. Basándonos en los resultados previos obtenidos al tratar espermatozoides frescos con Quinina, esperábamos observar que los espermatozoides almacenados a 1200 mOsm/kg y recuperados en medios de menor osmolalidad, necesitarían regular su volumen mediante los canales iónicos sensibles a Quinina.

Las trayectorias de los espermatozoides recuperados son más lineales porque salen de un medio de mayor viscosidad (crioprotector) y entran en otro de menos (principio del Swim-up). Al no observarse diferencias respecto de los tratados con el inhibidor Quinina, se evidencia claramente que el canal no está actuando para la regulación del shock osmótico. La hipótesis de trabajo fue que al ser bloqueados, cambiaría el patrón de movimiento, tal como sucedió con los espermatozoides frescos (disminución en VSL, VAP y LIN y aumento en ALH). Esto no resultó así, ya que no encontramos diferencias entre las variables cinéticas (valores semejantes de VSL, VAP y LIN) entre los espermatozoides recuperados a 400 o a 280 mOsm/kg. Los resultados sugerirían que los espermatozoides no estarían utilizando el canal de K^+ en esta situación de mayor osmolalidad, que al salir del PS. Esto nos lleva a pensar que quizás el sistema está sobrepasado debido a un gradiente de osmolalidad muy elevado (aproximadamente 900 mOsm/kg), sin que podamos descartar la utilización de otros sistemas no estudiados en este trabajo. Es posible también pensar que el canal haya sufrido una injuria por la criopreservación y ya no consiga ser bloqueado, por lo cual parecería resultar inactivo al inhibidor sin que los espermatozoides respondan en ningún caso al reto hipoosmótico. Cabe destacar que estudiamos solo los canales de K^+ sensibles a Quinina, no evaluando otras opciones de regulación.

Al evaluar los valores que describen los parámetros de movimiento se determinó que si bien no se percibieron diferencias entre los distintos tratamientos, resultaron semejantes a los valores que presentaban cuando fueron tratadas con el inhibidor Quinina sin criopreservación (en fresco) (VSL entre 15 y 20 $\mu\text{m/s}$; VAP \approx 25 $\mu\text{m/s}$ y LIN \approx 60, en todos los casos).

Esto podría estar indicando que el poro no está activo o que se hubiese deteriorado por el tratamiento de criopreservación. De todas maneras resultan

espermatozoides con trayectorias más progresivas que en el crioprotector, tal vez debido a la menor viscosidad del medio, la cual es elevada debido a las lipoproteínas del huevo, necesarias para proteger la membrana plasmática. Al generarse el shock hipoosmótico, era de esperar que el comportamiento fuera semejante al registrado cuando se estudio la acción del inhibidor de los canales de K^+ . Por lo tanto se tienen espermatozoides vivos, con relativo buen movimiento pero incapaces de soportar nuevos retos osmóticos. Como lo determina en su trabajo Correa, un cambio osmótico importante disminuye drásticamente el movimiento de espermatozoides de macaco (% de móviles totales y progresivos). Correa encontró este efecto al comparar un medio de 300 mOsm/kg con uno hiperosmolal de 600 mOsm/kg, utilizando incubaciones de 20 a 40 min y sin observar efecto sobre la viabilidad, y se lo atribuyen en su estudio a cambios en el citoesqueleto (Correa y col., 2007). El efecto iatrogénico sobre el citoesqueleto podría observarse en el primer contacto con el crioprotector o al descongelar para utilizar la muestra.

Al evaluar la morfología de los espermatozoides recuperados según los tratamientos descritos, se observó que presentaban anomalías en cabeza y en flagelo diferentes que para las muestra descongeladas. Mientras el % de espermatozoides con formas normales fue muy bajo en todos los casos y similar al descongelado (entre 5 y 10%), se evidenció una disminución en los espermatozoides con anomalía de cabeza dentro de la población recuperada en todas las condiciones por igual (entre 50 y 60%). Sin embargo, se duplicaron las anomalías de flagelo en los espermatozoides recuperados respecto del descongelado (entre 15 y 22%), lo cual podría estar relacionando un efecto del proceso de preservación sobre su citoesqueleto, así como sobre la falta de respuesta de los canales iónicos encargados de regular el volumen, lo cual haría que los espermatozoides modifiquen la forma del flagelo conservando la motilidad.

En las muestras recuperadas, los espermatozoides presentan una pérdida de acrosoma mayor, lo que podría reflejarse en una disminución de la población inducible, ya que los espermatozoides con acrosoma intacto son los que responden a los inductores, una vez reaccionados los espermatozoides solo pueden morir si no llegan a interactuar con el ovocito. Si bien como habíamos determinado, el tratamiento de criopreservación genera pérdida del acrosoma, es amplificado al separar los espermatozoides de la mezcla semen/crioprotector, mediante Swim-up, pasando a medios de osmolalidades menores, lo que se debe probablemente a la

exposición a un nuevo reto hipoosmótico, o por moverse hacia un medio menos viscoso debido a fricción y labilidad. Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerrequisito para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (Stornelli, 2005) el eyaculado es heterogéneo con una resistencia variable al estrés osmótico entre las células. El hecho de que los individuos puedan ser clasificados como “buenos respondedores a la criopreservación” o “malos malos respondedores” implica que ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas. Estudios del efecto de la criopreservación sobre la membrana celular sugieren que la agrupación de las proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible, esto podría tener implicancias sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción de gametas. Si bien estudios de fertilización *in vitro* han demostrado que los espermatozoides criopreservados son capaces de fecundar (Scott y col., 1990), sólo algunos acceden al proceso pero muchos otros podrían estar estructuralmente afectados y ser incapaces de interactuar con el ovocito.

Es factible que la asociación de injurias a las que resulta expuesto el espermatozoide durante la criopreservación, lleve a que sean sobrepasados sus sistemas de regulación osmótica y ya no sea capaz de adaptarse adecuadamente a un nuevo desafío osmótico. Lo que hace pensar que el tratamiento de criopreservación es deletéreo y quizás se amplificaría al recuperar los espermatozoides en medios de osmolalidades menores donde se los expone a un nuevo reto osmótico, perdiendo el capuchón acrosomal (aquí la variación sería de aproximadamente 900 mOsm/kg). Por lo que se aprecia, el canal sensible a Quinina parece no tener ya la capacidad de regular el volumen luego de exponer al espermatozoide a estas injurias. De todas maneras es sorprendente como esta célula aún se mantiene viable, con varios de sus parámetros dentro de rango aceptable y fértil.

A pesar de las injurias a la que se expone el espermatozoide durante estos procedimientos, se consiguen embarazos con las muestras criopreservadas (Scott y col., 1990). Si el número total de espermatozoides funcionales utilizados en una inseminación intrauterina con semen congelado cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fecundación, entonces la fertilidad se

ve afectada. Según la bibliografía, si se recuperan luego de la criopreservación e inseminan menos de 4×10^6 de espermatozoides móviles, se consigue un 9,1% de embarazos por ciclo, mientras que si el número asciende a 8×10^6 de espermatozoides móviles, se alcanzará un 17.2% (McLaughlin y Pacey, 2009).

Los tratamientos oncológicos actualmente utilizados resultan efectivos para remitir la patología de base y al parecer, preservarían la fecundidad. Sin embargo no se dispone a priori de herramientas para distinguir aquellos pacientes susceptibles a sufrir daño por la toxicidad de los fármacos y resultar posteriormente infértiles. La criopreservación de espermatozoides es una técnica no invasiva y sencilla, que le permite al paciente diferir el deseo de paternidad al atravesar un proceso oncológico donde se requieren tratamientos agresivos gonadotóxicos. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el perfil seminal de los pacientes expuestos a tratamientos oncológicos por un período de seguimiento de 1 a 3 años. La edad media de los mismos resultó de $26,6 \pm 0,7$ años y coincide ampliamente con el período reproductivo esperado de los mismos. Es alentador observar que el 96% de los pacientes estudiados, recuperó la producción espermática en menos de 3 años post tratamiento. Más de la mitad de los mismos (60%) alcanzó valores superiores a 20×10^6 esp./ml durante el control de rutina a los 12 meses post tratamiento. En cuanto a las variables seminales analizadas, tanto el volumen como la concentración y el % de espermatozoides progresivos, resultaron no ser diferentes a los 12 o 36 meses, respecto de los valores seminales que presentaban al momento de la criopreservación. También la velocidad media de desplazamiento se recuperó presentando valores similares a los basales previos a la quimio o radioterapia. De los pacientes que manifestaron voluntad de paternidad, 6 lograron el embarazo en forma espontánea. Sólo un paciente permaneció azoospermico luego del tratamiento (radioterapia) y logró embarazo y nacido vivo a partir de un tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad que consistió en la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) con las muestras criopreservadas.

Estos resultados demuestran claramente que las drogas utilizadas actualmente intentan comprometer lo menos posible el futuro reproductivo de los pacientes, quienes en su mayoría se encuentran en edad reproductiva.

F.- CONCLUSIONES

- ❖ La osmolalidad de los fluidos que contactan al espermatozoide desciende en sentido plasma seminal - ámpula.
- ❖ La osmolalidad del plasma seminal aumenta con el tiempo de almacenamiento del semen *in vitro*.
- ❖ El contacto de los espermatozoides con fluidos de osmolalidades dentro del rango estudiado (280-400), permite un desarrollo adecuado de la cascada de traducción de señales asociada al proceso de capacitación *in vitro*.
- ❖ Un aumento en la osmolalidad durante el manejo *in vitro* disminuye la cohorte de espermatozoides con posibilidades de fecundar, sin deteriorar su viabilidad.
- ❖ Al menos *in vitro*, los espermatozoides actúan como un osmómetro perfecto al ser separados del plasma seminal, siendo el K^+ una de las moléculas utilizadas durante la regulación del volumen.
- ❖ El efecto sinérgico entre la osmolalidad elevada y el efecto de la criopreservación/descongelamiento, sobrepasa el sistema de regulación osmótica del espermatozoide.
- ❖ El espermatozoide humano durante la criopreservación se mantiene viable y con parámetros funcionales dentro de rangos aceptables.

G.- BIBLIOGRAFIA

- Abou-haila A. y Tulsiani D.:** Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem and Biophysics* 485:72-81, 2009
- Aitken R.:** Evaluation of human sperm function. *British Medical Bulletin*. 46(3):654-674, 1990.
- Aitken R., Wang Y., Lui J., Best F. y Richardson D.:** The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: Development of an improved zona-free hamster penetrated test. *Int J Androl*. 6:180-193, 1983.
- Alexander N.:** Natural and induced immunological infertility. *Curr Opin Immunol*. 1(6):1125-1130, 1989.
- Austin C.:** The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. 170:326, 1952.
- Baibakov B., Gauthier L., Talbot P., Rankin T. y Dean J.:** Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development*. 134, 933-943, 2007.
- Bailey J.:** Review and hypothesis factors regulating sperm capacitation. *Systems Biol Reprod Med*. 56:334-348, 2010.
- Barfield J., Yeung C. y Cooper T.:** The effects of putative Kp channel blockers on volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod*. 72:1275-1281, 2005.
- Barratt C. y Cooke I.:** Sperm transport in the human female reproductive tract—a dynamic interaction. *Int J Androl*. 14(6):394-411, 1991.
- Bastias M., Kamijo H. y Osteen K.:** Assessment of human sperm functional changes after in-vitro coincubation with cells retrieved from the human female reproductive tract. *Hum Reprod*. 8(10):1670-1677, 1993.
- Bedford J. y Chang M.:** Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am J Physiol*. 202:179-181, 1962.
- Bedford J.:** Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod*. 28(1):108-20, 1983.
- Bielfeld P., Jeyendran R. y Zaneveld L.:** Osmo-sensitivity of the human sperm acrosome reaction. *Human Reprod*. 8(8):1235-1239, 1993.
- Björndhal L. y Kvist U.:** Séquence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod BioMed Online*. 7(4):440-448, 2003.
- Blackmore P., Beebe S., Danforth D. y Alexander N.:** Progesterone and 17 hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem*. 265:1376–1380, 1990.
- Blackmore P. y Lattanzio F.:** Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*. 27:181(1):331-336, 1991.
- Boatman D.E.:** Responses of gametes to oviductal environment. *Human Reprod*. 12 Natl Suppl, JBFS 2(2):133-149, 1997.
- Borland R., Hazra S., Biggers J. y Lechene C.:** The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol Reprod*. 16:147-157, 1977.
- Bosch P. y Wright R.:** The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. *Arch Med Vet*. 37(2), 2005.
- Brewis I., Moore H., Fraser L., Holt W., Baldi E., Luconi M., Gadella B., Ford W.C. y Harrison R.:** Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fertil* 8(4):253-261, 2005.

- Buffone M., Calamera J., Verstraeten S. y Doncel G.:** Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction*. 129(6):697-705, 2005.
- Burkman L.:** Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril*. 55(2):363-371, 1991.
- Burkman L., Overstreet J. y Katz D.:** A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *J Reprod Fert*. 71:367-376, 1984.
- Caille A.:** Influencia del ión potasio y la osmolalidad en los cambios fisiológicos que experimenta el espermatozoide humano incubado in-vitro. Tesis de Magíster, 1996.
- Caille A., Berta C., Cuasnicú P. y Munuce MJ.:** Peritoneal fluid modifies the response of human spermatozoa to follicular fluid. *Reprod BioMed Online*. 24(4):466-473, 2012.
- Calamera J.:** En: *El espermograma. Parámetros de fertilidad masculina*. Ed.: BAESA, Buenos Aires. 1977.
- Calvo L., Vantman D., Banks S., Tezon J., Koukoulis G., Dennison L. y Sherins R.:** Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril*. 52(6):1048-1054, 1989.
- Cañas P.:** Rol biológico y nutricional de la taurina y sus derivados. *Rev Chil Nutr*. 29(3), 2002.
- Carr D., Usselman M. y Acott T.:** Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod*. 33(3):588-595, 1985.
- Carr D., Fujita A., Stentz C., Liberty G., Olsoni G. y Narumiya S.:** Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *J Biol Chem*. 276(20):17332-17338, 2001.
- Carr D. y Newell A.:** The role of A-kinase anchoring proteins (AKaps) in regulating sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 63:135-141, 2007.
- Casslén B.:** Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med*. 32(3):181-184, 1987.
- Casslén B. y Nilsson B.:** Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol*. 150(7):877-881, 1984.
- Chan S. y Tucker M.:** Fertilization failure and disfunctions as possible causes for human idiopathic infertility. *Andrologia*. 23:399-414, 1991.
- Chan S., Pearlstone A., Uhler M., Tucker M., Greenspoon R., Leung A. y Wang C.:** Human spermatozoal tail hypoosmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline, and survival of spermatozoa after cryopreservation. *Human Reprod*. 8(5):717-721, 1993.
- Chang M.:** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature*. 168:697-698, 1952.
- Chiu P., Chung M., Tsang H., Koistinen R., Koistinen H. y Seppala M.:** Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem*. 280:25580-25589, 2005.
- Chow G., Muller Ch., Curnow E. y Hayes E.:** Expression of two-pore domain potassium channels in nonhuman primate sperm. *Fertil Steril*. 87(2):397-404, 2007.
- Cohen-Dayag A. y Eisenbach M.:** Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am J Physiol*. 267(5 Pt 1):C1167-1176, 1994.

- Cohen-Dayag A., Tur-Kaspa I., Dor J., Mashiach S. y Eisenbach M.:** Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:11039-11043, 1995.
- Cole J. y Meyers S.:** Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in Rhesus Macaque sperm. *J Androl.* 102-107, 2010.
- Cooper T. y Yeung C.:** Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of cytoplasmic droplets. *Microsc Res Tech.* 61:28-38, 2003.
- Cooper T., Yeung C.:** Sperm maturation in the human epididymis. En *Cap 4: The sperm cell. production, maturation, fertilization, regeneration.* Ed. por Christopher J. de Jonge y Christopher L. R. Barratt, Cambridge University Press, 2006.
- Cooper T. y Barfield J.:** Utility of infertile male models for contraception and conservation. *Mol Cell Endocrinol.* 250(1-2):206-211, 2006.
- Cooper T., Barfield J. y Yeung C.:** Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl.* 28(1):58-60, 2005.
- Cooper T., Barfield J. y Yeung C.:** The tonicity of murine epididymal spermatozoa and their permeability towards common cryoprotectants and epididymal osmolytes. *Reproduction.* 135:625-633. 2008.
- Correa L., Thomas A. y Meyers S.:** The Macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility, *Biol Reprod.* 77(6):942-953, 2007.
- Cross N.:** Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrossomally responsive to the agonist, progesterone: is the major inhibitor. *Biol Reprod.* 54:138-145, 1996.
- Cross N.:** Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59:7-11, 1998.
- Cross N., Morales P., Overstreet J. y Hanson F.:** Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol Reprod.* 38:235-244, 1988.
- Curry M., Millar J. y Watson P.:** The presence of water channel proteins in ram and human sperm membranes. *J Reprod Fertil.* 104:297-303, 1995.
- Davis B., Byrne R. y Hungund B.:** Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 558: 257-266, 1979.
- Davis B.:** Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:7560-7564, 1981.
- de Jonge C.:** Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update.* 11:205-214, 2005.
- du Plessis S., Kashou A., Benjamin D., Yadav S. Y Agarwal A.:** Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:36-48, 2011.
- Eddy E.:** The spermatozoon. En: *The physiology of reproduction.* p.:29. Ed.: E. Knobil y J. Neill y col.. Raven Press, Ltd., N.Y.. 1988.
- Eddy C. y Pauerstein C.:** Anatomy and physiology of the Fallopian tube. *Clin Obst Gynecol.* 23(4):1177-1193, 1979.
- Eliasson R.:** Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 28:1257, 1977.
- Eisenbach M.:** Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet.* 25(2):87-94, 1999.
- Elstein M. y Macdonald R.:** The relation of cervical mucus proteins to sperm penetrability. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 77(12):1123-1126, 1970.
- Elstein M.:** The cervix and its mucus. *Clin Obstet Gynaecol.* 1(2):345-368, 1974.

- Encinar Hidalgo J.:** Estudios estructurales de los fragmentos amino terminal de los canales de potasio tipo *Shaker B* nativo (ShB) y mutado (ShBL7E). Tesis Doctoral, 1998.
- Fetic S., Yeung CH., Sonntag B., Nieschlag E. y Cooper TG.:** Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 2006
- Ferrer Villada T.:** Determinantes estructurales del bloqueo del canal Herg por fármacos que incrementan la duración del Intervalo QT. Tesis Doctoral, 2004.
- Florman H., Corron M., Kim T. y Babcock D.:** Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 152(2):304-314, 1992.
- Fraser L.:** Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J Reprod Fertil.* 72:373-384, 1984.
- Fraser L. y Ahuja K.:** Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res.* 20:491-519, 1988.
- Fusi F. y Bronson R.:** Sperm surface fibronectin. Expression following capacitation. *J Androl.* 13(1):28-35, 1992.
- Fusi F., Vignali M., Busacca M. y Bronson R.:** Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol Reprod Dev.* 31(3):215-222, 1992.
- Gao D., Ashworth E., Watson P., Kleinhans F., Mazur P. y Critser J.:** Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49:112-123, 1993.
- Garrahan P. y Rega A.:** Comparison between plasma membrane Ca^{2+} and Na,K-ATPases: short review. *Braz J Med Biol Res.* 21(6):1261-1267, 1988.
- Geigy:** En: *Geigy Scientific Tables*. Vol. 1. Eighth Ed., Ed: Lentner C.. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland; p.:185-196, 1981.
- Geneser F.:** *Histología*, Ed Panamericana, p.:539-582, 1984.
- Georgiout A., Sostaric E., Wong C., Snijders A., Wright P., Moore H. y Fazeli A.:** Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cel Prot.* 4.11:1785-1796, 2005.
- Go K. y Wolf D.:** Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod.* 32:145-153, 1985.
- Griffiths G., Galileo D., Aravindan R. y Martin-DeLeon P.:** Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biol Reprod.* 81(3):562-570, 2009.
- Guerrero A., Carneiro J., Pimentel P., Wood C., Corkidi G. y Darszon A.:** Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Mol Hum Reprod.* 17(8):511-523, 2011.
- Gusani P., Skandhan K., Valsa C. y Menta Y.:** Sodium and potassium in normal and pathological seminal plasma. *Acta Eur Fertil.* 23(1):39-42, 1992.
- Gwathmey T., Ignotz G., y Suarez S.:** PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium In vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod.* 69:809-815, 2003.
- Hafez E.:** Function of the Fallopian tube in human reproduction. *Clin Obst Gynecol.* 22(1):61-78, 1979.
- Hafez E. y Black D.:** The mammalian uterotubal junction. En: *The mammalian oviduct: Comparative biology and methodology*. Ed: Hafez E. and Blandau R., p.:85-128. Chicago. 1969.
- Han H., Mack S., de Jonge C. y Zaneveld L.:** Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fertil Steril.* 54(6):1177-1179, 1990.

Harper M.: Gamete and zygote transport. En: The physiology of reproduction. Vol. 1. Ed: Knobil E. and Neill J., p.: 103-134, 1988.

Hunter R.: Human fertilization in vivo, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Human Reprod.* 2:229-232, 1987.

Hunter R. y Nichol R.: Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool.* 228(1):121-128, 1983.

Huxtable R.: Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 72(1):101-163, 1992.

Inaba K.: Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci.* 20(9):1043-1056, 2003.

Jaiswal B., Eisenbach M. y Tur-Kaspa I.: Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod.* 5(3):214-219, 1998.

Jaiswal B., Tur-Kaspa I., Dor J., Mashiach S. y Eisenbach M.: Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? *Biol Reprod.* 60(6):1314-1319, 1999.

Jeyendran R., Van der Ven H., Perez-Pelaez M., Crabo B. y Zaneveld L.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert.* 70:219-228, 1980.

Jin M., Fujiwara E., Kakiuchi Y., Okabe M., Satouh Y., Baba S., Chiba K., y Hirohashi N.: Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Developmental Biology*, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018202108, 2011.

Katila T.: In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet. Scand.* 42:199-217, 2001.

Katz D., Slade D. y, Nakajima S.: Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept.* 13(2-3):143-151, 1997.

Katz D. y Yanagimachi R.: Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod.* 25(4):785-791, 1981.

Katz D., Drobnis E. y Oversteet J.: Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.* 22(4):443-469, 1989.

Kervancioglu M., Djahanbakhch O. y Aitken R.: Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil Steril.* 61(6):1103-1108, 1994.

Killian G., Chapman D., Kavanaugh J., Deaver D. y Wiggin H.: Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 86(2):419-426, 1989.

Kirichok Y. y Lishko P.: Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod.* 17(8):478-499, 2011.

Kjellberg S., Björndahl L., Kvist U.: Sperm chromatin stability and zinc binding properties in semen from men in barren unions. *Int J Androl.* 15(2):103-113, 1992.

Klein T., Cooper T. y Yeung T.: The role of potassium chloride cotransporters in murine and human sperm volume regulation. *Biol Reprod.* 75:853-858, 2006.

Kosower N., Katayose H. y Yanagimachi R.: Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl.* 13(4):342-348, 1992.

Kruger T., Menkveld R., Stander F., Lombard C., Van den Merwe J., y Van Zyl J.: Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46:1118-1123, 1986.

- Kruger T., Acosta A., Simmons K., Swanson R., Matta J. y Oehninger S.:** Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 49:112-117, 1988.
- Kvist U.:** Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa. *Acta Physiol Scand Suppl.* 486:1-24, 1980.
- Laemmlli U.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685, 1970.
- Leese H.:** The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil.* 82:843-856, 1988.
- Leese H., Tay J., Reischl J. Y Downing S.:** Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction.* 121:339-346, 2001.
- Lin M., Cheng C., Yang Y. y Tsai T.:** Recovery of motile sperm using the osmolality gradient technique. *A Androl.* 27:177-184, 1991.
- Lishko P. y Kirichok Y.:** The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol.* 588(Pt 23):4667-4672, 2010.
- Liu D. y Baker H.:** Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril.* 58(6):1178-1184, 1992.
- Liu D., Baker H., Pearse M. y d'Apice A.:** Normal sperm zona pellucida interaction and fertilization in vitro in alpha-1,3-galactosyltransferase gene knockout mice. *Mol Hum Reprod.* 3:1015-1016, 1997.
- Liu D., Clarke G. y Baker H.:** Hyper-osmotic condition enhances protein tyrosine phosphorylation and zona pellucida binding capacity of human sperm. *Hum Reprod.* 21(3):745-752, 2006.
- Llanos M.:** The mammalian sperm acrosome reaction: Biochemical aspects. *Arch Biol Med Exp.* 22:25-36, 1989.
- Maier U., Kirchheimer J., Hienert G., Christ G. y Binder B.:** Fibrinolytic parameters in spermatozoas and seminal plasma. *J Urol.* 146(3):906-908, 1991.
- Malette B., Paquette Y. y Bleau G.:** Size variations in the mucin-type domain of hamster oviductin: identification of the polypeptide precursors and characterization of their biosynthetic maturation. *Biol Reprod.* 53(6):1311-1323, 1995.
- Mann T. y Lutwak-Mann C.:** Male fertility and sterility. p.:89. Ed.: Mancini-Martini. Academic Press, London.1981.
- Martín G., Sabido O., Durand P. y Levy R.:** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in Bull sperm. *Biol Reprod.* 71:28-37, 2004.
- Martínez P. y Morros A.:** Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* 1(1):d103-117, 1996.
- Mbizvo M., Burkman L. y Alexander N.:** Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril.* 54(4):708-712, 1990.
- McCarthy M., Baumber J., Kass P. y Meyers S.:** Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus Macaque spermatozoa. *Biol Reprod.* 82(3):644-651, 2010.
- McLaughlin E. y Pacey A.:** Cryopreservation and storage of spermatozoa. En *Textbook of assisted reproductive technologies, Laboratory and clinical perspectives*, Cap 23. 3rd Edition Ed.: Gardner, Weissman, Howles, Shoham. United Kingdom, 2009, Informa Healthcare. London.
- Meizel S., Lewis C., Working D. y Mrsny R.:** Taurine and hypotaurine: their effects on motility in sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids on several animals. *Develop Growth Differ.* 22:483-494, 1980.
- Meizel S.:** Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat.* 174:285-302, 1985.

- Melendrez C., Ruttle J., Halford D., Chaudhry P. y Casillas E.:** Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *J Androl.* 13(4):293-296, 1992.
- Mendoza C., Carreras A., Moos J. y Tesarik J.:** Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil.* 95:755-763, 1992.
- Miller D., Shi X. y Burkin H.:** Molecular basis of mammalian gamete binding. *Endoc Soc.* 37-73, 2002.
- Miranda P., Gonzalez-Echeverría F., Marín-Briggiler C., Brandelli A., Blaquier J. Mortimer S. y Mortimer D.:** Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl.* 11(3):195-203, 1990.
- Mitchell J., Nelson L. y Hafez E.:** Motility of spermatozoa. En: *Human semen and fertility regulation in men.* Hafez E. Ed.: The CV Mosby Company St. Louis. 83-99, 1976.
- Moghissi K.:** Postcoital tests. *Reproduccion.* 5(4):281-294, 1981.
- Mortimer D.:** The essential partnership between diagnostic andrology and modern assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 9(7):1209-1213, 1994.
- Mortimer S. y Mortimer D.:** Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl.* 11(3):195-203, 1990.
- Mortimer S., Swan M.:** Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod.* 10(12):3178-3182, 1995.
- Mortimer D., Leslie E., Kelly R. y Templeton A.:** Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fétil.* 64:391-399, 1982.
- Mortimer D., Shu M., Tan R. y Mortimer S.:** A technical note on diluting semen for the haemocytometric determination of sperm concentration. *Hum Reprod.* 4(2):166-168, 1989.
- Munuce M., Caille A., Berta C., Morisoli L. y Cuasnicú P.:** Efecto modulador de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la función del espermatozoide humano. *Reproducción XV.* 2: 99-107, 2000.
- Munuce MJ., Marin-Briggiler C., Caille A., Berta C., Cuasnicú P. y Morisoli L.:** Modulation of human sperm function by peritoneal fluid. *Fertil Steril.* 80(4):939-946, 2003.
- Munuce MJ., Caille A., Quintero I., Ghersevich S. y Berta C.:** Estudio comparativo de las características bioquímicas del fluido peritoneal y folicular periovulatorio humano. *Rev Soc Arg Endoc Gin Reprod,* ISSN 1515-8845, 2004a.
- Munuce MJ., Caille A., Botti G. y Berta C.:** Modulation of human sperm function by follicular fluid *Andrologia.* 36(6):395-401, 2004b.
- Munuce MJ., Quintero I., Caille A., Ghersevich S., Berta C.:** Comparative concentrations of steroid hormones and proteins in human peri-ovulatory peritoneal and follicular fluids. *Reprod Biomed Online.* 13(2):202-207, 2006.
- Munuce MJ., Serravalle A., Caille A., Zumoffen C., Botti G., Cabada M. y Ghersevich G.:** Human tubal secretion can modify the affinity of human spermatozoa for the zona pellucida. *Fertil Steril,* 2008.
- Navarro B., Kirichok Y., Chung J. y Clapham D.:** Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 52:607-613, 2008.
- Naz R.:** Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Front Biosc.* 1:200-213, 1996.
- Negendak W.:** The state of water in the cell. *Science of biological specimen preparation.* 507:21-32, 1986.

Newell A., Fiedler S., Ruan J., Pan J., Wang P., Deininger J., Corless C. y Carr D.: Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil Cytoskeleton*. 65(7):539-552, 2008.

Noiles E., Mazur P., Watson P., Kleinhans F. y Critser J.: Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. *Biol Reprod*. 48:99-109, 1993.

Okamura N., Tajima Y., Soejima A., Masuda H. y Sugita Y.: Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260(17):9699-9705, 1985.

OMS (Organización Mundial de la Salud): WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1999.

OMS: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Oxford University Press, 2011.

Osman R., Andrea M., Jones D. y Meizel S.: Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 160:828-833, 1989.

Overstreet J. y Cooper G.: Effect of ovulation and sperm motility on the migration of rabbit spermatozoa to the site of fertilization. *J Reprod Fertil*. 55(1):53-59, 1979.

Paasch U., Grunewald S., Wuendrich K., Jope T. y Glander H.: Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl*. 7(1):61-69, 2005.

Pacey A., Davies N., Warren M., Barratt C. y Cooke I.: Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod*. 10(10):2603-2609, 1995.

Pauerstein C. y Eddy C.: Morphology of the fallopian tube. En: *The biology of the fluids of the female genital tract*. p.:299. Ed.: F.K. Beller y G.F.B. Schumacher. Else North Holland Inc., 1980.

Petrunkina AM, Harrison RA, Ekhlesi-Hundrieser M y Topfer-Petersen E.: Role of volume-stimulated osmolyte and anion channels in volume regulation by mammalian sperm. *Mol Hum Reprod*. 10:815-823, 2004.

Pholpramool C. y Chaturapanich G.: Effect of sodium and potassium concentrations and pH on the maintenance of motility of rabbit and rat epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 57(1):245-251, 1979.

Pilikian S. y Mimouni P.: Comparative study of the kinetics of the acrosome reaction and survival of human spermatozoa in various media. *Int J Androl*. 11(6):465-472, 1988.

Publicover S., Giojalas L., Teves ME., Mendes Machado de Oliveira G., Morales Garcia A., Barratt C. y Harper C.: Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Nature Cell Biol*. 9:235-242, 2007.

Qi H., Moran M., Navarro B., Krapivinsky J., Krapivinsky L., Kirichok Y., Ramsey I. y Clapham D.: All form Catsperm ion channel proteins are required for mammalian sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(4):1219-1223, 2007.

Qiao J., Yeung W., Yao Y. y Ho P.: The effects of follicular fluid from patients with different indications for IVF treatment on the binding of human spermatozoa to the zona pellucida. *Hum Reprod*. 13(1):128-31, 1998.

Quinn P. y Payne A.: Steroid product-induced, oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in Leydig cell cultures. Relationship to desensitization. *J Biol Chem*. 260:2092-2099, 1985.

Quintero I., Ghersevich S., Caille A., Munuce M.J., Danielle S. y Morisoli L.: Effet of human oviductal in vitro secretions on spermatozoa and search for sperm oviductal proteins interactions. *Int. J. Androl*. 28:137-143, 2005.

- Reid A., Redgrove K., Aitken R. y Nixon B.:** Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl.* 13:88-96, 2011.
- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A., Hsu S., Shi Q., Tilly J. y Clapham D.:** A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413:603-609, 2001.
- Roblero L., Guadarrama A., Ortiz M., Fernandez E. y Zegers-Hochschild F.:** High potassium concentration improves the rate of acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 49(4):676-679, 1988.
- Roblero L., Guadarrama A., Ortiz M., Fernandez E. y Zegers-Hochschild F.:** High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 54(2):328-332, 1990.
- Roblero L. y Riffo M.:** High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil Steril.* 45(3):412-416, 1986.
- Rosenborg L., Rao K., Björndahl L., Kvist U., Pousette A., Akerlöf E. y Fredricsson B.:** Changes in human sperm chromatin stability during preparation for in-vitro fertilization. *Int J Androl.* 13(4):287-96, 1990.
- Rossato M., di Virgilio F. y Foresta C.:** Involvement of osmo-sensitive calcium influx in human sperm activation. *Mol Human Reprod.* 2:903-909, 1996.
- Rutlant J., Pommer A. y Meyers S.:** Osmotic tolerance limits and properties of Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J of Androl.* 24(4), 2003.
- Scott S., Mortimer D., Taylor P., Leader A. y Pattinson A.:** Therapeutic donor insemination with frozen semen. *CMAJ.* 143(4): 273-278, 1990.
- Shalgi R., Smith T. y Yanagimachi R.:** A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biol Reprod.* 46(3):419-24, 1992.
- Shalgi R. y Phillips D.:** Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol Reprod.* 1988 Dec;39(5):1207-13.
- Si W., Benson J., Men H. y Critser J.:** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology.* 53(3):336-48, 2006.
- Sidhu K. y Guraya S.:** Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int. Rev. Cytol.* 118:231-269, 1989.
- Smith T. y Yanagimachi R.:** Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil.* 91:567-573, 1991.
- Smith T., Koyangi F. y Yanagimachi R.:** Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after mating and artificial insemination. *Biol Reprod.* 37:225-234, 1987.
- Storey B., Lee M., Muller C., Ward C. y Wirtshafter D.:** Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: Evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol Reprod.* 31:1119-1128, 1984.
- Stornelli, 2005**
- Suarez S.:** Regulation of sperm transport in the mammalian oviduct *En The male gamete.* Ed.: Claude Gagnon. Cache River Press. p.:71-80, 1999.
- Suarez S. y Pacey A.:** Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reprod Update.* 12(1):23-37, 2006.
- Suarez S., Wolf D. y Meizel S.:** Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14:107-121, 1986.
- Suarez S., Dai X., DeMott R., Redfern K. y Miranda M.:** Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl.* 13(1):75-80, 1992.

- Sullivan R., Frenette G. y Girouard J.:** Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 9(4):483-491, 2007.
- Syrop H. y Halme J.:** Peritoneal fluid environment and infertility. *Fertil Steril.* 48(1):1-9, 1987.
- Talaei T., Esmaelpour T., Aekiyash F. y Bahmanpour S.:** Effects of cryopreservation on plasma membrane glycoconjugates of human spermatozoa. *Iranian J Reprod Med.* 8(3):119-124, 2010.
- Tauber P., Zaneveld L., Propping D. y Schumacher G.:** Components of human split ejaculates. II. Enzymes and proteinase inhibitors. *J Reprod Fertil.* 46(1):165-71, 1976.
- Tay J., Rutherford A., Killick S., Maguiness S., Partridge R. y Leese H.:** Human tubal fluid: production and nutrient composition and response to adrenergic agents. *Human Reprod.* 12(11):2451-2456, 1997.
- Tesarik J.:** Acrosome reaction testing. In advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE Andrology Special Interest Group-Proceedings of a Consensus Workshop. Coordinated by Mortimer D. and Fraser L. *Human Reprod.* 3:5-8, 1996.
- Teves M., Guidobaldi H., Unates D., Sanchez R., Miska W., Publicover S., Morales Garcia A. y Giojalas L.:** Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS ONE* 4(12):e8211, 2009.
- Therien I., Moreau R. y Manjunath P.:** Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* 59:768-776, 1998.
- Tomes C., Carballada R., Moses D., Katz D. y Saling P.:** Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod.* 4:17-25, 1998.
- Toshimori K.:** Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. *J Electronmicr.* 60(1):31-42, 2011.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J.:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. (USA).* 76:4358-4364, 1979.
- Toyoda Y. y Chang M.:** Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K-Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J Reprod Fertil.* 36(1):125-134, 1974.
- Turner K. y Meizel S.:** Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 213(3):774-780, 1995.
- Visconti P., Bailey J., Moore G., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf G.:** Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121:1129-1137, 1995a.
- Visconti P., Moore G., Bailey J., Leclerc P., Connors S., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf G.:** Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121:1139-50, 1995b.
- Waites G.:** Permeability of the seminiferous tubules and the rete testis to natural and synthetic compounds. *J Reprod Fertil Suppl.* (24 suppl):49-69, 1976.
- Wang C., Baker H., Jennings M., Burger H. y Lutjen P.:** Interaction between human cervical mucus and sperm surface antibodies. *Fertil Steril.* 44(4):484-488, 1985.
- Wang C., Lee G., Leung A., Surrey E. y Chan S.:** Human sperm hyperactivation and acrosome reaction and their relationships to human in vitro fertilization. *Fert Steril.* 59(6):1221-1227, 1993.

Wassarman P.: Early events in mammalian fertilization. *Annu Rev Cell Biol.* 3:109-142, 1987.

Watson P., Kunze E., Cramer P. y Hammerstedt R.: A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *J Androl.* 13(2):131-138, 1992.

Wen R., Li S., Wang C., Wang Q., Li Q., Feng H., Jiang Y. y Zhang X.: Analysis of spermatozoa from the proximal vas deferens of fertile men. *Int J Androl.* 16(2):87-91, 1993.

White D. y Aitken R.: Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22(2):163-177, 1989.

Williams M., Hill C., Scudamore I., Dunphy B., Cooke I. y Barratt C.: Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod.* 8(12):2019-2026, 1993.

Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals, En: *Fertilization and embryonic development in vitro.* Ed: Mastroianni L. and Biggers J.D., p.:81-182. New York, Plenum Press, 1981.

Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization. En *The physiology of reproduction*, E. Knobil and J. Neill, Ed., p.:189-317. Raven Press, New York. 1994.

Yao Y., Chiu C., Ip S. Ho P. y Yeung W.: Glycoproteins present in human follicular fluid that inhibit the zona-binding capacity of spermatozoa. *Hum Reprod.* 13(9):2541-2547, 1998.

Yavas Y. y Selub M.: Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen Collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen Collection to IUI time. *Fertil Steril.* 82(6):1638-1647, 2004.

Yeung W., Ng V., Lau E. y Ho P.: Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Human Reprod.* 9(4):656-660, 1994.

Yeung C. y Cooper T.: Effects of the ion-channel blocker quinine on human sperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels. *Mol Hum Reprod.* 7:819-828, 2001.

Yeung C., Anapolski M., Sipila P., Wagenfeld A., Poutanen M., Huhtaniemi I., Nieschlag E. y Cooper T.: Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation. *Biol Reprod.* 67:269-275, 2002.

Yeung C., Anapolski M., Depenbusch M., Zitzmann M. y Cooper T.: Human sperm volumen regulation. Response to physiological changes in osmolality, channel blockers and potential sperm osmolytes. *Human Reprod.* 18(5):1029-136, 2003.

Yeung C., Barfield J., Anapolski M. y Cooper T.: Volume regulation of mature and immature spermatozoa in a primate model and possible ion channels involved. *Hum Reprod.* 19:2587-2593, 2004a.

Yeung C., Anapolski M., Setiawan I., Lang F. y Cooper T.: Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volumen regulation of fertile and infertile *c-ros* transgenic mice. *J Androl.* 25(2):216-223, 2004b.

Yeung C., Barfield J. y Cooper T.: The role of anion channels and Ca²⁺ in addition to K⁺ channels in the physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 71(3):368-79, 2005a.

Yeung C., Barfield J. y Cooper T.: Chloride channels in physiological volume regulation of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 73:1057-1063, 2005b.

Yeung C., Barfield J. y Cooper T.: Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 250:98-105, 2006.

Young R. y Bodt B.: Development of computer-directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions. *J Androl.* 15(4):362-377, 1994.

Yoshida K., Yamasaki T., Yoshiike M., Takano S., Sato I. e Iwamoto T.: Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl.* 24(6):878-884, 2003.

Zalata A., Christophe A., Depuydt C., Schoonjans F. y Comhaire F.: The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Molecular Human Reprod.* 4(2):111-118, 1998.

Zaneveld L., De Jonge C., Anderson R. y Mack S.: Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod.* 6(9):1265-1274, 1991.

Zhang D. y Gopalakrishnan M.: Sperm ion channels: review molecular targets for the next generation of contraceptive medicines?. *J Androl.* 26(6):643-653, 2005.

Zhu, J., Barratt, C., Lippes, J., Pacey, A y Cooke, I.: The sequential effects of human cervical mucus, oviductal fluid, and follicular fluid on sperm function. *Fertil Steril.* 61:1129-1135, 1994a.

Zhu J., Barratt C., Lippes J., Pacey A. y Lenton E.: Human oviductal fluid prolongs sperm survival. *Fertil Steril.* 61:360-366, 1994b.

Zumoffen C., Caille A., Munuce MJ-, Cabada M. y Ghersevich S.: Proteins from human oviductal tissue-conditioned medium modulate sperm capacitation. *Hum Reprod.* 25:1504-1512, 2010.

ANEXO: Consentimientos
CONSENTIMIENTOS ESCRITOS:

Consentimiento para la utilización de muestras de semen humano:

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide.

El donante no recibirá tratamiento alguno antes de la obtención de la muestra de semen y el único requisito será un período de 3 a 5 días de abstinencia sexual. El uso del material in vitro no causará efectos adversos en el paciente, ni representará ningún riesgo para el mismo. Bajo ningún concepto se utilizarán las muestras de semen para la fertilización de ovocitos humanos. Todos los registros del donante serán absolutamente confidenciales.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída) Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Voluntariamente acepto participar como donante en este estudio para llevar a cabo experimentos utilizando mi semen. Entiendo que la utilización de mi semen no implica riesgo alguno para mi persona, y que mi semen nunca será utilizado para estudios de fertilización de ovocitos. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Consentimiento para la utilización de fluidos corporales (MOCO CERVICAL)

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide.

Solicitamos su autorización para la utilización del moco cervical sobrante que es obtenido durante el test de Sims Hühner. .

El uso del material no implicará ningún riesgo ni efecto adverso para usted ni comprometerá de ninguna manera el tratamiento realizado por su médico. Rutinariamente el moco cervical se descarta una vez evaluado por el médico. Asimismo, toda la información se manejará en forma confidencial.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída) Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto, entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Doy mi consentimiento para que el moco cervical que es obtenido durante el test de Sims Hühner, sea utilizado en el proyecto de investigación mencionado en esta página. El moco cervical será utilizado en el estudio experimental. Así mismo, tengo pleno entendimiento que el uso del fluido en el proyecto de investigación no implicará ningún riesgo para mí, y que los resultados obtenidos podrán ser de beneficio para el avance de la medicina. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Consentimiento para la utilización de ovocitos humanos

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide. Solicitamos su autorización para la utilización de los ovocitos no fertilizados provenientes de un programa de fertilización *in vitro*. Los ovocitos no fertilizados remanentes serán conservados en solución salina a 4 °C con lo que el citoplasma ovocitario degenera y sólo permanece inalterada la cubierta..

El uso de los ovocitos no fertilizados no implicará ningún riesgo ni efecto adverso para usted ni comprometerá de ninguna manera el tratamiento realizado por su médico. Rutinariamente los ovocitos no fertilizados se descartan. Asimismo, toda la información se manejará en forma confidencial.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída) Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto, entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Doy mi consentimiento para que los ovocitos no fertilizados que son obtenidos durante la aspiración folicular del procedimiento de reproducción asistida, sean utilizados en el proyecto de investigación mencionado en esta página. Los ovocitos no fertilizados serán utilizado en el estudio experimental. Así mismo, tengo pleno entendimiento que el uso de los ovocitos no fertilizados en el proyecto de investigación no implicará ningún riesgo para mí, y que los resultados obtenidos podrán ser de beneficio para el avance de la medicina. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Consentimiento para la utilización de fluidos corporales (FLUIDO OVIDUCTAL)

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide.

Solicitamos su autorización para la utilización del fluido que es obtenido en el lavado oviductal luego del procedimiento de ablación oviductal. De la muestra obtenida, el fluido oviductal será utilizado en el estudio.

El uso del fluido no implicará ningún riesgo ni efecto adverso para usted ni comprometerá de ninguna manera el tratamiento realizado por su médico. Rutinariamente los oviductos se descartan. Asimismo, toda la información se manejará en forma confidencial.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída) Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto, entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Doy mi consentimiento para que el fluido que es obtenido mediante lavado oviductal, luego del procedimiento de ablación, sea utilizado en el proyecto de investigación mencionado en esta página. El fluido oviductal será utilizado en el estudio experimental. Así mismo, tengo pleno entendimiento que el uso del fluido en el proyecto de investigación no implicará ningún riesgo para mí, y que los resultados obtenidos podrán ser de beneficio para el avance de la medicina. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Consentimiento para la utilización de fluidos corporales (FLUIDO FOLICULAR)

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide.

Solicitamos su autorización para la utilización del fluido que es obtenido en la aspiración folicular durante el procedimiento de reproducción asistida. De la muestra obtenida, el fluido folicular y no los ovocitos, será utilizado en el estudio.

El uso del fluido no implicará ningún riesgo ni efecto adverso para usted ni comprometerá de ninguna manera el tratamiento realizado por su médico. Rutinariamente el fluido se descarta. Asimismo, toda la información se manejará en forma confidencial.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída) Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto, entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de la osmolalidad de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Doy mi consentimiento para que parte del fluido que es obtenido con los ovocitos durante la aspiración folicular del procedimiento de reproducción asistida, sea utilizado en el proyecto de investigación mencionado en esta página. El fluido folicular y no los ovocitos será utilizado en el estudio experimental. Así mismo, tengo pleno entendimiento que el uso del fluido en el proyecto de investigación no implicará ningún riesgo para mí, y que los resultados obtenidos podrán ser de beneficio para el avance de la medicina. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Consentimiento para la utilización de fluidos corporales (FLUIDO PERITONEAL)

Rosario,/...../.....

El objetivo del presente proyecto es el estudio de la influencia de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud del paciente, los mismos contribuirán a un mejor conocimiento de la fisiología del espermatozoide.

Solicitamos su autorización para aspirar fluido peritoneal durante el procedimiento de laparoscopia diagnóstica. La aspiración del fluido peritoneal no comprometerá de ningún modo el procedimiento realizado por su doctor. El uso del fluido no implicará ningún riesgo ni efecto adverso para usted ni comprometerá de ninguna manera el tratamiento realizado por su médico. Asimismo, toda la información se manejará en forma confidencial.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída). Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. De acuerdo a esto entiendo que el objetivo de los experimentos es estudiar la influencia de las secreciones del tracto reproductivo femenino sobre la habilidad fecundante del espermatozoide y que los resultados obtenidos serán de utilidad para una mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide.

Doy mi consentimiento para que se me aspire fluido peritoneal durante el procedimiento de laparoscopia diagnóstica. Comprendo que el procedimiento realizado por mi médico, es necesario para el tratamiento de mi esterilidad y no ha sido programado o modificado para los fines de la investigación aquí propuesta.

Asimismo, tengo pleno entendimiento que el uso del fluido en el proyecto de investigación no implicará ningún riesgo para mí, y que los resultados obtenidos podrán ser de beneficio para el avance de la medicina. Tengo conocimiento de que mis datos personales se manejarán en forma CONFIDENCIAL, y que puedo dejar de participar del estudio cuando lo desee.

Nombre: _____

Firma del donante: _____