

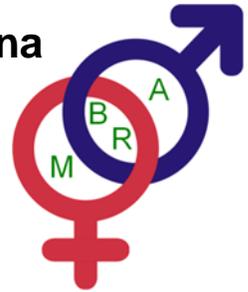


Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Maestría en Biología de la Reproducción Animal

“Evaluación de la presencia de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata, detección *in situ* vs *ex situ*”

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal
presenta:

Biól. Jesús Quezada Vidal

Director de Tesis

Dr. Andrés Aragón Martínez

Asesores

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dra. María Del Socorro Retana Márquez

México, Distrito Federal Enero 2014

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Andrés Aragón Martínez

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

andresammx@yahoo.com

ASESOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

pgdm@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. María Del Socorro Retana Márquez

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

rems@xanum.uam.mx

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción, creado por el Dr. Andrés Aragón Martínez, del Departamento de Biología de la Reproducción, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Pubertad y de Citometría de Flujo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) con el nivel de reciente creación.

Para la realización de los estudios de maestría el alumno Jesús Quezada Vidal contó con el apoyo de la beca institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana y la beca CONACYT mediante el número de registro CVU/Becario 418251/302735.

Este trabajo fue desarrollado con recursos de los proyectos “Influencia de las caspasas activas presentes en los espermatozoides sobre la fertilización”, clave UAM-PTC-363.2013 y “Factores celulares, genéticos y endocrinos relacionados con alteraciones en la maduración espermática”, clave UAM-I-CA-136.2013.

Dra. María Elena Ayala Escobar, jefa del Laboratorio de Pubertad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Dra. Adriana Altamirano Bautista y Dr. Román Hernández Meza, responsables del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por su valiosa ayuda con la selección y el manejo de los animales.

Guadalupe Gómez García, por su apoyo técnico en el manejo del citómetro de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Miembros del Jurado

Los miembros del jurado fueron aprobados por la Comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada:

“Evaluación de la presencia de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata, detección *in situ* vs *ex situ*”

Que presentó

Biól. Jesús Quezada Vidal

El día 29 de enero del 2014

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



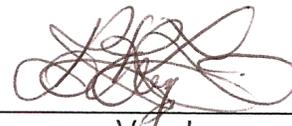
Presidente

Dra. Edith Arenas Ríos
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Secretario

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Vocal

Dr. Miguel Ángel León Galván
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal

Agradecimientos

Al **Dr. Andrés Aragón Martínez**, por haberme aceptado de nuevo y dirigir este proyecto de investigación en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción, por todas sus enseñanzas, y sobre todo por sus palabras “**Tu reputación se construye con tu trabajo**”.

Al **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura** y **Dra. María del Socorro Retana Márquez** por haber aceptado ser asesor de la tesis, por sus valiosas sugerencias otorgadas en la realización de este proyecto.

A la **Dra. María Elena Ayala Escobar** y a su **grupo de trabajo**, por permitir realizar el proyecto de investigación en el laboratorio de Pubertad y de Citometría de Flujo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la **Dra. Rosalina Reyes Luna**, **Dra. Edith Arenas Ríos**, **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**, **Dr. Miguel Ángel León Galván** porque gracias a sus observaciones y sugerencias este trabajo es mejor. Gracias por el tiempo y disposición para este trabajo.

A mis **profesores de la MBRA** por haber compartido sus conocimientos y permitirme aprender lo maravilloso que es la Biología de la Reproducción, por sus consejos y apoyo en la presente tesis.

A mis **compañeros y amigos de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal** por el tiempo que pasamos juntos, por su comprensión, ayuda y amistad.

A **Cindy Rivas A.**, **Claudia Morales E.** y **Luis Becerril M.** por su apoyo incondicional y amistad que me ha demostrado en todo momento dentro del LABREP.

Dedicatorias

A mis padres Jesús Quezada M y Piedad Vidal M

A mi hermana Guadalupe Quezada V

**Porque veo al final de mi rudo camino que yo fui
el arquitecto de mi propio destino;**

Amado Nervo

Índice de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Espermatogénesis de la rata.....	5
2.1 Espermatogénesis de la rata.....	5
2.2 Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis.....	6
3. La muerte celular: la apoptosis.....	9
3.1 Las caspasas.....	9
3.2 Mecanismo de activación de las caspasas.....	11
3.3 Detección y evaluación de las caspasas.....	12
3.4 Marcaje de las caspasas activas <i>in situ</i> (FLICA) o <i>ex situ</i> (NucView) por substratos fluorogénicos.....	14
3.4.1 FLICA.....	15
3.4.2 NucView.....	16
3.5 Otros tipos de muerte celular: la necrosis, la autofagia y otras variaciones de la muerte celular.....	17
4. ANTECEDENTES.....	19
4.1 Las caspasas y su relación con los espermatozoides de humanos.....	19
4.2 Las caspasas activas en los espermatozoides y su relación con la fertilización.....	22
4.3 Papel no apoptótico de la caspasa 3 en las células somáticas.....	23
5. Hipótesis.....	24
6. Justificación.....	25
7. Objetivos.....	26
7.1 General.....	26

7.2	Específicos	26
8.	Material y Métodos	27
8.1	Diseño experimental	27
8.2	Material Biológico	28
8.3	Procedimiento para extracción de las muestras espermáticas	28
8.4	Detección de las caspasas 3 y 7 activas	28
8.4.1	FLICA	28
8.4.2	NucView	29
8.4.3	FLICA más NucView	29
8.4.4	Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA, zDEVD+FLICA, zDEVD+IMQ+FLICA	30
8.4.5	Espermatozoides de rata tratados con IMQ+NucView, zDEVD+NucView y zDEVD+IMQ+NucView	30
8.4.6	Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA+NucView, zDEVD+FLICA+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView	31
8.4.7	Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA, IMQ+NucView, IMQ+FLICA+NucView	32
8.4.8	Espermatozoides de rata tratados con zDEVD+FLICA, zDEVD+NucView y zDEVD+FLICA+NucView	32
8.4.9	Espermatozoides de rata tratados con zDEVD+IMQ+FLICA, zDEVD+IMQ+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView	33
8.5	Cuantificación de los espermatozoides de rata con caspasas activas 3 y 7 por citometría de flujo	34
8.6	Observación de los espermatozoides de rata marcados con FLICA o NucView o ambos por microscopía de fluorescencia	34
9.	Estadística	36
10.	Resultados	37

10.1	Marcaje individual de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata por FLICA o NucView	37
10.2	Marcaje de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata por FLICA más NucView.	39
10.3	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA, NucView o ambos.	41
10.4	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA y sus diferentes tratamientos.....	42
10.5	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con NucView y sus diferentes tratamientos	43
10.6	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA+NucView y sus diferentes tratamientos.....	44
10.7	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con IMQ+FLICA, IMQ+NucView e IMQ+FLICA+NucView	45
10.8	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con zDEVD+FLICA, zDEVD+NucView, zDEVD+FLICA+NucView	46
10.9	Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con zDEVD+IMQ+FLICA, zDEVD+IMQ+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView	47
10.10	Detección de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata marcados con FLICA o NucView por microscopía de fluorescencia.....	48
11.	Discusión	51
12.	Conclusión	58
13.	Bibliografía.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema que representa las diferentes etapas de la espermatogénesis.....	6
Figura 2. Esquema que representa el control neuroendocrino de la espermatogénesis.....	8
Figura 3. Ilustración que representa la clasificación de las caspasas con base en su función	10
Figura 4. Esquema que representa las dos principales rutas de activación de las caspasas efectoras.	12
Figura 5. Representación gráfica de la excitación y emisión de espectro del sustrato que enzimáticamente es dividido por la caspasa 3 y 7 activa (NucView 488 caspase-3)	13
Figura 6. Mecanismo de acción del reactivo de FLICA.....	15
Figura 7. Mecanismo de acción del reactivo de NucView.....	16
Figura 8. Diagrama de actividades del diseño experimental.....	27
Figura 9. Histogramas representativos de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas marcados con FLICA o NucView.....	38
Figura 10. Citogramas representativos de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas de las muestras evaluadas con FLICA más NucView.....	40
Figura 11. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> o ambos.....	41
Figura 12. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas <i>in situ</i>	42
Figura 13. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas <i>ex situ</i>	43
Figura 14. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas en un marcaje dual.	44
Figura 15. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con el inductor IMQ.....	45
Figura 16. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con el inhibidor zDEVD-fmk.	46

Figura 17. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con zDEVD-fmk+IMQ	47
Figura 18. Micrografías de los espermatozoides sin fluorescencia (a) campo claro, (b) campo de fluorescencia.....	49
Figura 19. Micrografías de espermatozoides incubados con FLICA y NucView.....	50

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Detección de las caspasas.....	14
Cuadro 2. Tipos de muerte celular y sus características morfológicas.....	18
Cuadro 3. Expresión de caspasas activas en los espermatozoides de especies de interés pecuario.	21
Cuadro 4. Información mínima en un trabajo de Citometría de Flujo.	35

Abreviaturas

ABP Proteína ligadora de andrógenos

ACh Acetilcolina

ADN Ácido desoxirribonucleico

AMPc Adenosin monofosfato cíclico

Apaf-1 Factor activador de apoptosis 1

ATP Adenosin trifosfato

BAX Proteína X asociada a Bcl-2

BCL-2 Proteínas de la células b Linfoma 2

BHT Barrera hematotesticular

Bid Proteína BH3 parecida a Bax

CARD Dominio de reclutamiento de la caspasa

CF Citometría de Flujo

CL Célula de Leydig

CREB Proteína de unión al elemento de respuesta activado por AMPc

CS Célula de Sertoli

DED Dominio efector de muerte

DEVD Aspartil-glutamil-valil-aspartato

E₂ Estradiol

ERO Especies reactivas de oxígeno

FADD Proteína de muerte celular asociada a Fas

Fas Miembro 6 de la superfamilia del receptor TNF

FasR Receptor de Fas

FAK Cinasa de adhesión focal

FICT Isotiocianato de fluoresceína

FLICA Marcador inhibidor fluorescente de caspasas

FMK Fluorometilcetona

FSH Hormona estimulante de los folículos

FSHR Receptor de la FSH

GABA Ácido gamma-aminobutírico

GnRH Hormona liberadora de gonadotrofinas

GTP Guanosín trifosfato

IMQ Imiquimod

kDA kilo daltones

LH Hormona luteinizante

LHR Receptor de LH

MF Microscopía de fluorescencia

NCCD Comité de Nomenclatura en Muerte Celular

NKD Neuroquinas, kisspeptinas, dinorfinas,

NPY Neuropeptido Y

OMS Organización Mundial de la Salud

PKA Proteína cinasa A

RIP_{1,3} Proteína de interacción con el receptor 1, 3

Spc Espermatocito

Spg Espermatogonia

Spm Espermátida

Spz Espermatozoide

SR Sulforrodamina

T Testosterona

TNF Factor de Necrosis tumoral

TNFR Receptor del TNF

TRAIL Ligando parecido al inductor apoptótico TNF

VAD Valil- Alalil-Asparto

zDEVD-fmk inhibidor de DEVD

Resumen

Las caspasas 3 y 7 activas son consideradas clave en la señalización de la apoptosis en las células somáticas y células germinales testiculares. Existen dos estrategias que permiten identificar a las células que expresan caspasas activas, el marcaje *in situ* y el marcaje *ex situ*. El objetivo del presente trabajo fue investigar si existen diferencias en los porcentajes de espermatozoides marcados con las diferentes estrategias bajo distintos esquemas de inducción o de inhibición de caspasas activas. Las muestras espermáticas se obtuvieron de siete ratas macho (CII-ZV) de 90 días de edad, sexualmente maduros y con fertilidad comprobada. Los espermatozoides con caspasas 3 y 7 activas fueron tratados con el inductor imiquimod (IMQ) o el inhibidor zDEVD o ambos y marcados *in situ* (FLICA) o *ex situ* (NucView) o FLICA+NucView, y evaluados por citometría de flujo. Los porcentajes de espermatozoides marcados con FLICA, NucView, IMQ+FLICA e IMQ+NucView no presentaron diferencias significativas; pero hubo diferencias entre los tratamientos IMQ, zDEVD o IMQ+zDEVD y marcados con FLICA+NucView. Mediante microscopía de fluorescencia se identificaron espermatozoides marcados con FLICA, y espermatozoides marcados con NucView; pero en un marcaje FLICA+NucView algunos espermatozoides que fueron negativos a FLICA fueron positivos al reactivo de NucView. No se observaron diferencias en los porcentajes de los espermatozoides que expresan caspasas activas cuando se utilizó FLICA o NucView; sin embargo, se presentaron diferencias entre los porcentajes de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas cuando los espermatozoides se incubaron con FLICA + NucView.

Abstract

Active caspases 3- and -7 are considered key in somatic and testicular germ cell apoptosis signalization. Strategies of in situ or ex situ label permits to identify cell expressing active caspases. The goal of the present work was to investigate whether exists differences between percentages of sperm labeled with distinct strategies and treated with inducers or inhibitors of active caspases. Sperm samples were obtained from seven males (CII-ZV), 90 days old, sexually mature and probed fertility. Sperm with active caspases -3 and -7 were treated with the inducer imiquimod (IMQ) or inhibitor zDEVD, or both, and labeled in situ (FLICA) or ex situ (NucView), or FLICA+NucView, and evaluated by flow cytometry. No differences were observed among percentages of sperm labeled with FLICA, NuCView, IMQ+FLICA e IMQ+NucView; however differences among treatments IMQ, zDEVD or IMQ+zDEVD labeled with FLICA+NucView. Sperm labeled with FLICA or NucView were identified by fluorescence microscopy, but when FLICA+NucView labeling was realized sperm FLICA negatives and NucView positives were observed. There were not differences between percentages of sperm positives to FLICA or NucView; although percentages of sperm expressing active caspases -3 and -7 were observed when labeling FLICA + NucView was realized.

1. Introducción

Los espermatozoides son el resultado de la espermatogénesis (Eddy, 2006). La fertilización es el proceso por el cual los espermatozoides y el ovocito, se fusionan para producir un individuo genéticamente distinto de los progenitores. La fertilización requiere de un espermatozoide hábil, capaz de penetrar la zona pelúcida y fertilizar el ovocito (Florman y Ducibella, 2006). Por otro lado, la infertilidad es una condición que afecta entre el 10-15% de las parejas, alrededor del mundo (WHO, 2010). El hombre representa el 50% de la infertilidad, siendo la infección o daño en el aparato reproductor, las alteraciones en el control neuroendocrino de la regulación de la espermatogénesis y los factores genéticos constituyen las principales etiologías de infertilidad masculina (Gibson y Ahmad, 2013).

La infertilidad primaria o secundaria se ha relacionado con el estilo de vida, la condición de salud, el uso de agentes tóxicos, que provocan alteraciones en la espermatogénesis dando origen a los espermatozoides con daño, como lo son los espermatozoides eyaculados que expresan fragmentación del ADN (Aitken y Koppers, 2011) o como lo pudieran ser aquellos espermatozoides que expresan las caspasas activas y que podrían relacionarse con la disminución en la capacidad del individuo de llevar a cabo la fertilización (Taylor *et al.*, 2004).

Las caspasas son una familia de proteasas que reconocen una secuencia peptídica de cisteína unida al ácido aspártico, son consideradas una “llave” dentro de la apoptosis en las células somáticas, se dividen en dos grupos: caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras; en las células somáticas la activación de las caspasas ejecutoras se considera como el “punto de no retorno”, es decir, la célula está condenada a morir (Grunewald *et al.*, 2009). Los espermatozoides recolectados del epidídimo y los eyaculados presentan caspasas ejecutoras activas, pero no se ha

determinado que estos espermatozoides mueran por apoptosis como sucede en las células somáticas (García *et al.*, 2012).

En las células somáticas, las caspasas ejecutoras pueden ser activadas a través del estrés celular generado por la incubación por periodos largo o mediante el uso de agentes químicos, como el imiquimod (Kim *et al.*, 2010). Las caspasas ejecutoras 3 y 7 activas tienen una estructura diferente, pero comparten la hidrólisis péptido de reconocimiento DEVD (aspartil- glutamil- valil- aspártato) (Grunewald *et al.*, 2009).

Diversa instrumentación científica como el citómetro de flujo (CF) y la microscopia de fluorescencia (MF) son utilizadas para la detección de caspasas activas, ya sea detectando miles de células por segundo o la localización en una o varias células respectivamente (Brugnon *et al.*, 2007). Las caspasas 3 y 7 activas pueden ser marcadas *in situ* por substratos comerciales como FLICA, el substrato sintético es reconocido y dividido por la caspasas 3 y 7, el fragmento dividido se une covalentemente al sitio activo de la caspasas mediante la fluorometilcetona, bloqueando su actividad y emitiendo fluorescencia. (Amstad *et al.*, 2001). Las caspasas 3 y 7 activas se han localizado *in situ* en la pieza media, en la pieza principal, en la región postacrosomal y en la fosa de implantación en los espermatozoides de borrego (Pichardo *et al.*, 2010).

Mientras que con el substrato comercial NucView, las caspasas 3 y 7 se han localizado *ex situ*, esto se debe a que el substrato es reconocido y dividido por las caspasas 3 y 7, el fragmento del substrato que contiene el fluorógeno se dirige hacia el núcleo, emite fluorescencia, mientras que el sitio activo de la caspasa permanece intacto, NucView no inhibe la actividad de la caspasa 3 y 7 activa (Cen *et al.*, 2008), que se detallará más adelante. La especificidad de los substratos se ha corroborado por inductores de apoptosis, como la estaurosporina, el peróxido de hidrogeno y el imiquimod e inhibidores no fluorescentes como zDEVD-fmk o zVAD-fmk (Pichardo *et al.*, 2010).

2. Espermatogénesis de la rata

2.1 Espermatogénesis de la rata

La espermatogénesis es un proceso complejo que incluye la diferenciación de los espermatozoides a partir de células indiferenciadas (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas), que inicia durante la pubertad y termina con la muerte. La espermatogénesis ocurre en el epitelio de los túbulos seminíferos en los testículo e involucra cuatro procesos: el primero consiste en la renovación de las células por mitosis; el segundo proceso involucra la producción y expansión de células tallo por mitosis y diferenciación; el tercer proceso consiste en la reducción del número de cromosomas en cada célula progenitora por meiosis, mientras que el cuarto proceso consiste en la diferenciación de los espermatozoides, células haploides (Kerr *et al.*, 2006).

En un corte transversal de un túbulo seminífero, se distinguen dos regiones, el compartimento basal y el compartimento apical delimitados por la barrera hemato-testicular. En el compartimento basal las espermatogonias se renuevan y proliferan por mitosis y comienzan a diferenciarse a espermatogonias tipo B, las que a su vez se diferencian en espermatocitos. Los espermatocitos se diferencian a espermátidas, por meiosis I y meiosis II (Fawcett, 1975; Kerr *et al.*, 2006).

Durante la meiosis II, los espermatocitos en diploteno se diferencian a espermátidas redondas, eventualmente a espermátidas alargadas y finalmente se diferencian en espermatozoides. Estas características son tipificadas por la condensación del material genético que forma el núcleo de ovoide a alargado, la formación de un acrosoma, el desarrollo y elongación del flagelo con la formación empaquetada de la mitocondrias en la pieza media. La comunicación entre las células germinales indiferenciadas y las células somáticas es esencial para la regulación de la espermatogénesis (Cheng y Mruk, 2011) (Figura 1).

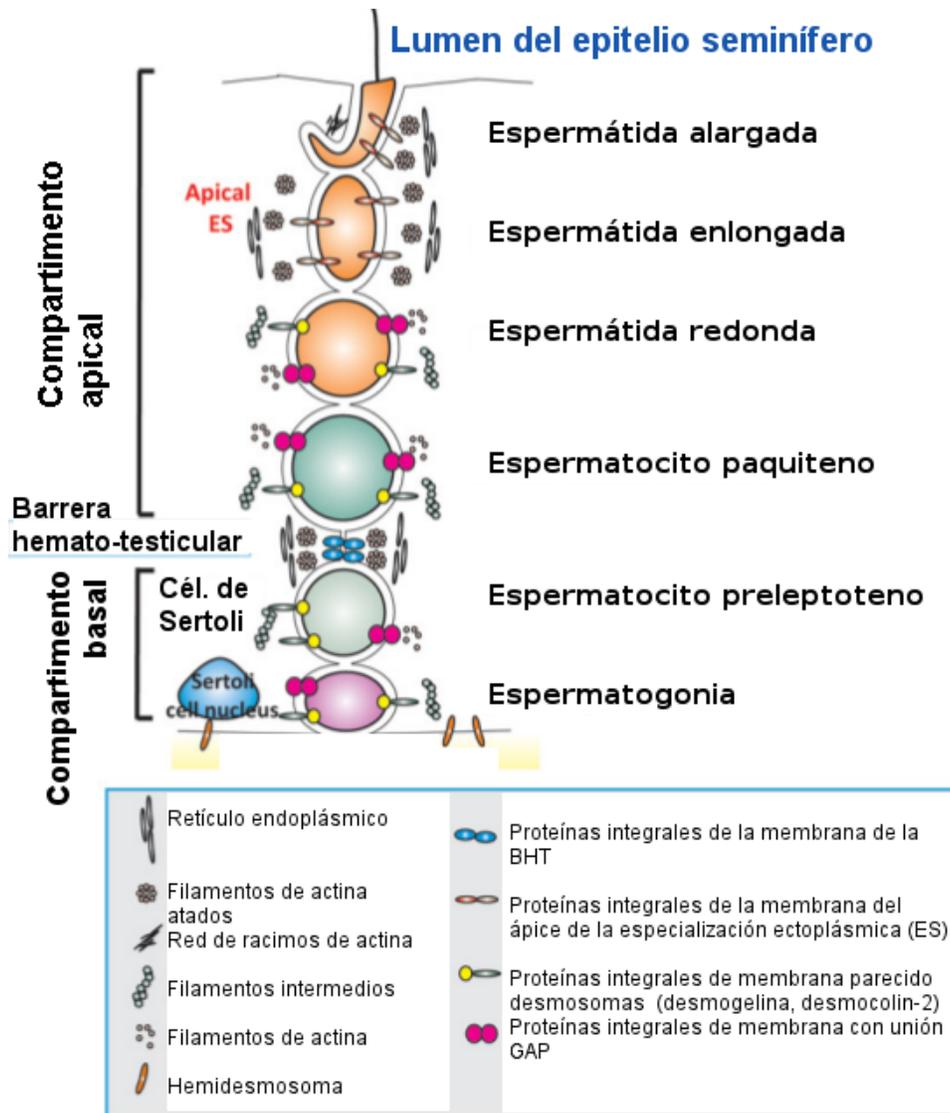


Figura 1. Esquema que representa las diferentes etapas de la espermatogénesis. Modificado de Cheng y Mruk, 2011.

2.2 Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis

La regulación de la espermatogénesis en los mamíferos está dada por las gonadotropinas FSH y LH y por las hormonas sexuales testosterona y estrógenos, en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Carreau *et al.*, 2002). En el hipotálamo, en las neuronas GnRHérgicas se sintetiza, almacena y secreta GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas) a partir de la señalización de las kisspeptinas, NKD, de

neurotransmisores como serotonina, dopamina, endorfinas, Ach, GABA y de hormonas como leptina y melatonina (O'Donell *et al.*, 2006).

La GnRH secretada viaja a través del sistema portal hipofisiario, y llega a los gonadótropos en la hipófisis anterior, mismos que sintetizan, almacenan y secretan FSH y LH; dependiendo de la pulsatilidad, la FSH y LH viajan por el torrente sanguíneo hasta los testículos; la FSH se une a su receptor FSHR en las células de Sertoli, mientras que la LH se une a su receptor LHR en las células de Leydig (O'Donell *et al.*, 2006).

Las células de Leydig, sintetizan, almacenan y secretan testosterona; que es biosintetizada *de novo* a partir de acetato y utiliza el colesterol como intermediario, la biotransformación de pregnenolona a androstendiona y testosterona en los mamíferos puede proceder a través de dos diferentes vías (Δ^4 , Δ^5), según la especie, órgano endocrino o ambos; la testosterona se puede sintetizar a partir de hormonas corticosteroides, aunque en menor concentración (Lemus y Pérez-Palacios, 2001).

La testosterona es transportada por la proteína ABP hacia los diferentes órganos blanco. La concentración elevada de testosterona y estrógenos en sangre inhibe la síntesis y secreción de GnRH en el hipotálamo. Además las células de Sertoli secretan inhibina que actúa en la hipófisis bloqueando la liberación de FSH y LH (McLachlan, 2000; Ruwanpura *et al.*, 2010). La disrupción del eje hipotálamo-hipófisis-testículo por promueve la muerte de células germinales por apoptosis (Aragón *et al.*, 2005) (Figura 2).

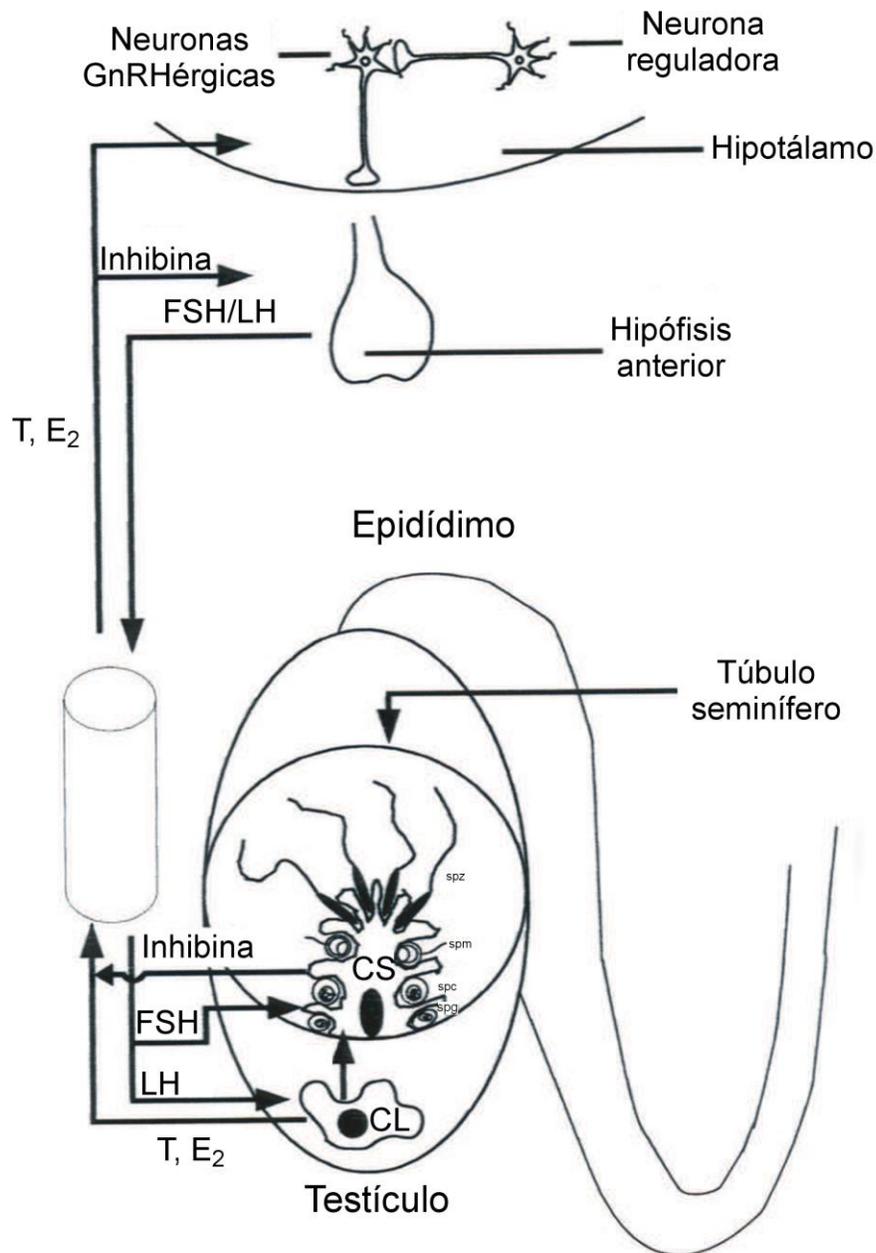


Figura 2. Esquema que representa el control neuroendocrino de la espermatogénesis GnRH, Hormona liberadora de gonadotrofinas; FSH, Hormona Folículo Estimulante; LH, Hormona Luteinizante; T, testosterona; E2, estradiol; CL, células de Leydig; CS, célula de Sertoli; spg, espermatogonia; spc, espermatocito; spm, espermátida; spz, espermatozoide. Modificado de Aragón *et al.*, (2007).

3. La muerte celular: la apoptosis

El término apoptosis fue establecido en el año de 1972 por Kerr y colaboradores, proviene del griego *apo* que significa separación y *ptosis* que significa caída, y hace referencia a la caída de las hojas de los árboles como producto de un envejecimiento y muerte celular de las hojas (Kerr *et al.*, 1972). La apoptosis es definida por un conjunto de cambios morfológicos que ocurren en la célula y que incluyen la formación de burbujas en la membrana, la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la pérdida de adhesión con células periféricas y la formación de cuerpos apoptóticos; permite mantener un equilibrio entre la proliferación y muerte celular (Kerr *et al.*, 1972). En varios estudios se ha demostrado que el uso de agentes anticancerígenos por ejemplo, el imiquimod, es usados como inductor de apoptosis, en líneas derivadas de cáncer en modelos *in vitro* (Kaufmann y Earnshaw, 2000).

En las células somáticas y en las células germinales testiculares, la apoptosis ocurre de forma natural y se ha conservado a través de la evolución (Kierzembraum, 2001; Lamkanfi *et al.*, 2007). En la apoptosis se han distinguido tres fases: la fase inicial, la fase de ejecución y la fase de eliminación (Kiechle y Zhang, 2002). El componente central y ejecutor del fenómeno de apoptosis son proteasas llamadas caspasas (Nicholson, 1996).

3.1 Las caspasas

Las caspasas activas forman parte de la señalización de la apoptosis, se consideran una llave en la apoptosis (Grunewald *et al.*, 2009), y no debe interpretarse como apoptosis (Kroemer y Martin, 2005). El término caspasas proviene de la conjunción de términos del inglés **cysteiny**-**aspartate**-**specific proteases**, y se refiere a una familia de proteasas de cisteína y ácido aspártico, que tiene en la cisteína su sitio activo y que realizan cortes proteolíticos en un residuo de ácido aspártico de sus

sustratos; las caspasas inactivas o procaspasas están conformadas por un prodominio CARD (Dominio de reclutamiento de la caspasa) o un prodominio DED (Dominio efector de muerte) el cual depende de la función de la caspasa y tres dominios: un dominio amino terminal (NH₂), una subunidad larga de 20 kDa y una subunidad corta de 10 kDa (Crawford y Wells, 2011).

Las caspasas activas están conformadas por dos heterotetrámeros (dos procaspasas que se unen por interacción del grupo amino en las subunidades cortas) con dos sitios activos. Las caspasas son clasificadas en tres grupos con base en su estructura y función: el grupo uno las caspasas proinflamatorias (1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) las cuales están involucradas en procesos de inflamación y diferenciación celular; el grupo dos las caspasas iniciadoras de la apoptosis (2, 8, 9 y 10) y el grupo tres las caspasas ejecutoras de la apoptosis (3, 6 y 7) (Grunewald *et al.*, 2009) (Figura 3).

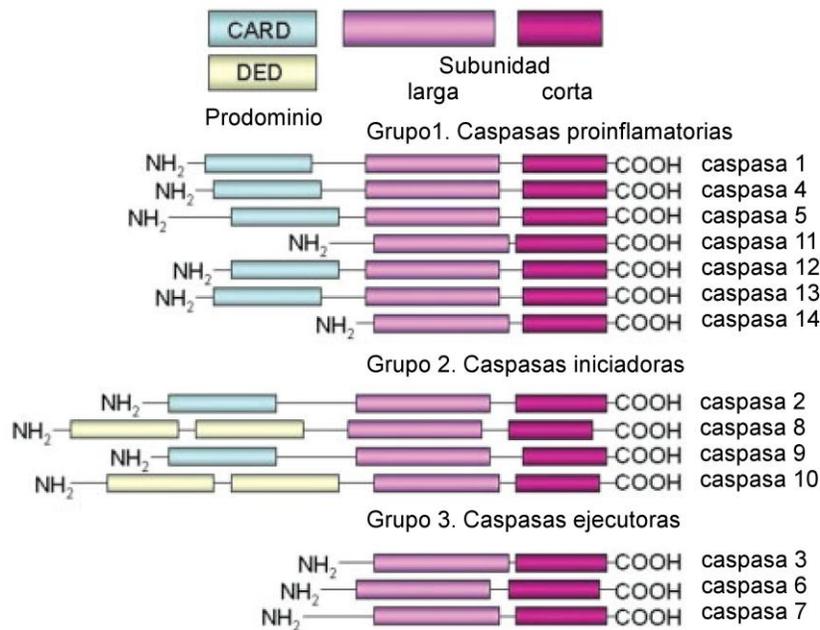


Figura 3. Ilustración que representa la organización (grupo amino, dominio amino terminal, subunidad larga y subunidad corta) y clasificación de las caspasas con base en su estructura y función, las caspasas contienen su dominio CARD, dominio de reclutamiento de la caspasa (p.e. caspasa 2) o dominio DED, dominio efector de muerte (p.e. caspasa 8). Tomado de Grunewald *et al.*, 2009.

3.2 Mecanismo de activación de las caspasas

En las células somáticas, las caspasas (2, 3, 6, 7, 8 y 9) se localizan en el citosol, aunque las caspasas 2 y 3 también se han localizado en fracciones subcelulares nucleares (Van Loo *et al.*, 2002). Existen dos principales rutas de activación de las caspasas, la vía extrínseca y la vía intrínseca; la vía extrínseca involucra la unión de un trímero ligando Fas o CD95 con su receptor FasR o CD95R en la superficie de la membrana plasmática. Esta señalización promueve que las proteínas asociadas a FasR (FADD) recluten dos heterodímeros de la procaspasa 8 y se unan mediante el dominio NH₂; acto seguido la procaspasa 8 pasa a su forma activa como caspasa 8 activa (Boatright y Salvesen, 2003).

La vía intrínseca es originada por factores de estrés que promueven la liberación del citocromo c de la membrana interna de la mitocondria hacia el citosol, esta liberación es facilitada por las proteínas mitocondriales Bax/Bid o en su defecto la liberación de citocromo c puede ser retenida por la proteína mitocondrial Bcl-2. El citocromo c en el citosol se une a la proteína Apaf-1, la cual ésta asociada a la procaspasa 9, para que la procaspasa 9 pase a su forma activa se va llevar a cabo la formación de un complejo denominado apoptosoma de 7 trímeros. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas ejecutoras (3, 6, 7) (Boatright y Salvesen, 2003).

Una vía más que permite la activación de las caspasas ejecutoras es la vía del retículo endoplásmico, la liberación de Ca⁺⁺ del retículo endoplásmico activa a las calpaínas y a su vez a la caspasa 12, y a su vez activa a la caspasa 9 y finaliza con la activación de las caspasas 3, 6 o 7 (Ruwanpura *et al.*, 2010). También se ha observado que la caspasa 3 puede autoactivarse, ya sea a través de la proteólisis de la misma procaspasa 3, o bien, a través de la proteólisis de las procaspasas 8 y 9 (Kroemer y Martin, 2005). La activación masiva de las caspasas ejecutoras es denominada como el “punto de no retorno”, es decir, la célula ésta condenada a morir (Grunewald *et al.*, 2009) (Figura 4).

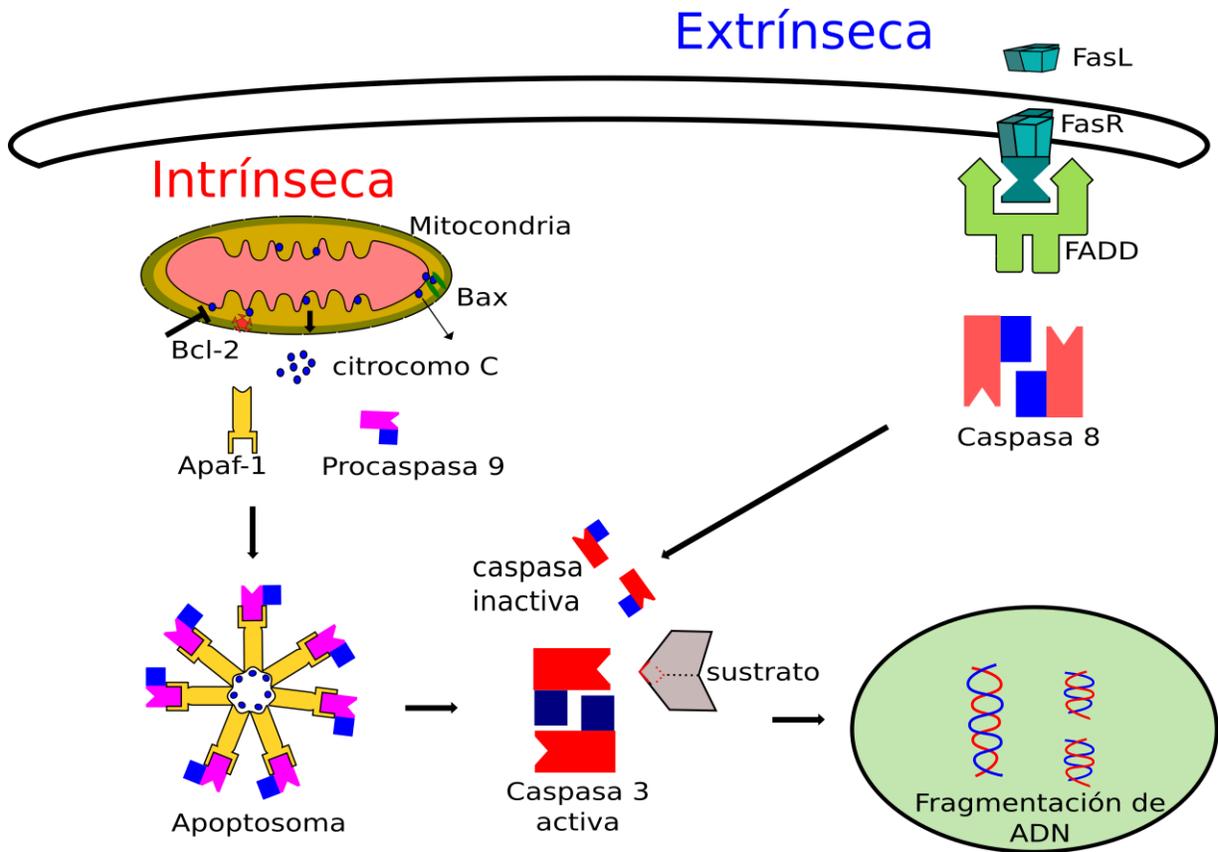


Figura 4. Esquema que representa las dos principales rutas de activación de las caspasas efectoras.

3.3 Detección y evaluación de las caspasas

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz que se caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas a una longitud de onda específica y simultáneamente emite parte de esa energía a una longitud de onda mayor, usualmente en el espectro electromagnético, entre los 400 y 700 nm (Young, 1961) (Figura 5). Las moléculas que han sido excitadas a un nivel de energía superior por absorción de radiación electromagnética, los electrones permanecen en estado excitado, y asumiendo que el exceso de energía no se pierda, el electrón excitado retorna a su estado basal

emitiendo la energía sobrante, energía de longitud de onda mayor (menor energía) (Young, 1961).

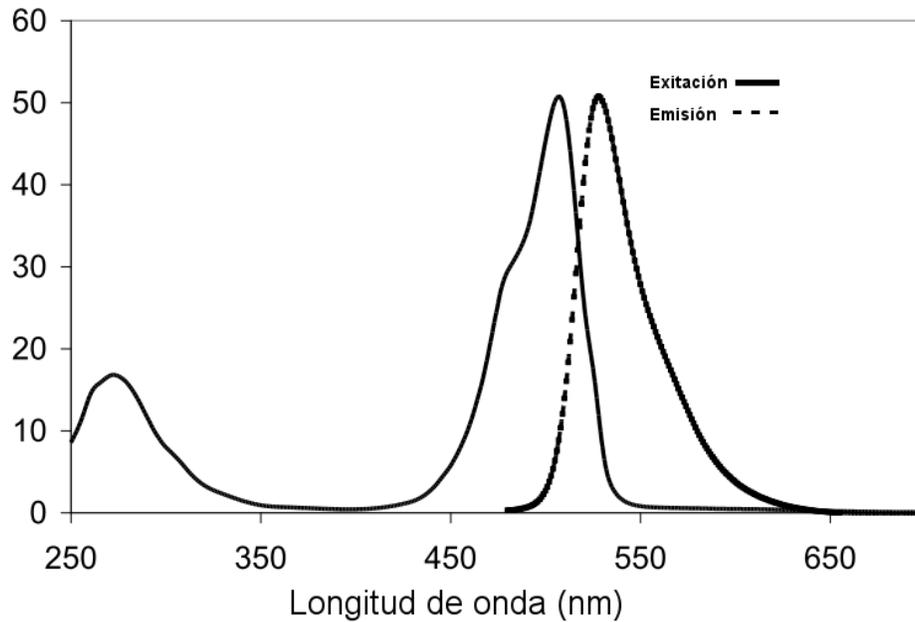


Figura 5. Representación gráfica de la excitación y emisión de espectro del sustrato que enzimáticamente es dividido por la caspasa 3 y 7 activa (NucView 488 caspase-3, Biotium Inc. Hayward, CA, USA).

Diversa instrumentación científica, por ejemplo el citómetro de flujo (CF) y la microscopía de fluorescencia (MF) han sido utilizados para la detección de la fluorescencia celular. En células no individuales (tejido) se ha usado la MF, mientras que en las células individuales, por ejemplo, los espermatozoides eyaculados que expresan las caspasas activas, han sido detectados por ambos métodos, también se ha detectado por otros métodos (Cuadro 1).

La evaluación de los espermatozoides que expresan las caspasas activas podrían permitir evaluar la calidad espermática (Taylor *et al.*, 2004) o podrían estar relacionadas directamente con la capacidad de fertilización (Marchetti y Marchetti, 2004).

Cuadro 1. Detección de las caspasas. Modificado de (Kroemer *et al.*, 2009).

Tipo de muerte celular	Característica Bioquímica	Método de detección
Apoptosis	Caspasas	Colorimetría/ substratos fluorogénicos en células vivas Colorimetría/ substratos fluorogénicos en células lisadas CF-MF/ anticuerpos que reconocen la forma activa de la caspasa CF-MF/ anticuerpos específicos para substratos divididos por las caspasas CF-MF/ substratos fluorogénicos Ensayos de inmunoblots del estado activo de la caspasa Ensayos de inmunoblots de los productos divididos por las caspasas

La citometría de flujo provee una detección rápida y extensa del número de células individuales y marcadas por algún fluorógeno, por ejemplo, en el citómetro de flujo, los espermatozoides que fueron marcados o no, viajan por una red de canales terminan por alinearse célula por célula, el láser impacta a cada espermatozoide, si el espermatozoide es positivo, el haz de luz rebota hacia fotodetectores que amplifican la señal y traduce la información en señal eléctrica (Graham, 2001), por tanto, se puede cuantificar cientos de células por segundo, y recopilar la información de cada espermatozoide (Graham *et al.*, 2000).

3.4 Marcaje de las caspasas activas *in situ* (FLICA) o *ex situ* (NucView) por substratos fluorogénicos

Los reactivos de FLICA, NucView y el inhibidor no fluorescente zDEVD (z-DEVD-fmk), interaccionan con el centro activo de las caspasas 3 y 7 a través de una secuencia de aminoácidos específica (aspartil-glutámil-valil- aspartato, DEVD), FLICA y zDEVD-fmk establecen una unión es covalente con el sitio activo de la caspasa, con FLICA se ha determinado la ubicación *in situ* de las caspasas 3 y 7 activas, por ejemplo, en los espermatozoides se ha localizado particularmente en la

pieza media (Pichardo *et al.*, 2010), mientras, que con el reactivo de NucView es reconocido y dividido por las caspasas 3 y 7 activas sin bloquear su actividad (Cen *et al.*, 2008).

3.4.1 FLICA

La actividad de las caspasas 3 y 7 activas son marcadas con el reactivo de FLICA (del inglés, fluorochrome-labeled inhibitors of caspases). SR-DEVD-fmk es un substrato sintético, permeable a la membrana y no citotóxico, está conformado por tres compuestos: un grupo sulforrodamina (SR) que es conjugado con el péptido DEVD que es la secuencia reconocida por las caspasas 3 y 7 activas y una fluorometilcetona (fmk) que asocia covalentemente con el sitio de las caspasas. Las caspasas 3 y 7 cuando están activas reconocen y dividen el péptido DEVD en el aminoácido D, posteriormente la fmk se asocia al sitio activo de la caspasas (Figura 6). La emisión y excitación máxima del reactivo de FLICA es de 559/595 nm (Amstad *et al.*, 2001).

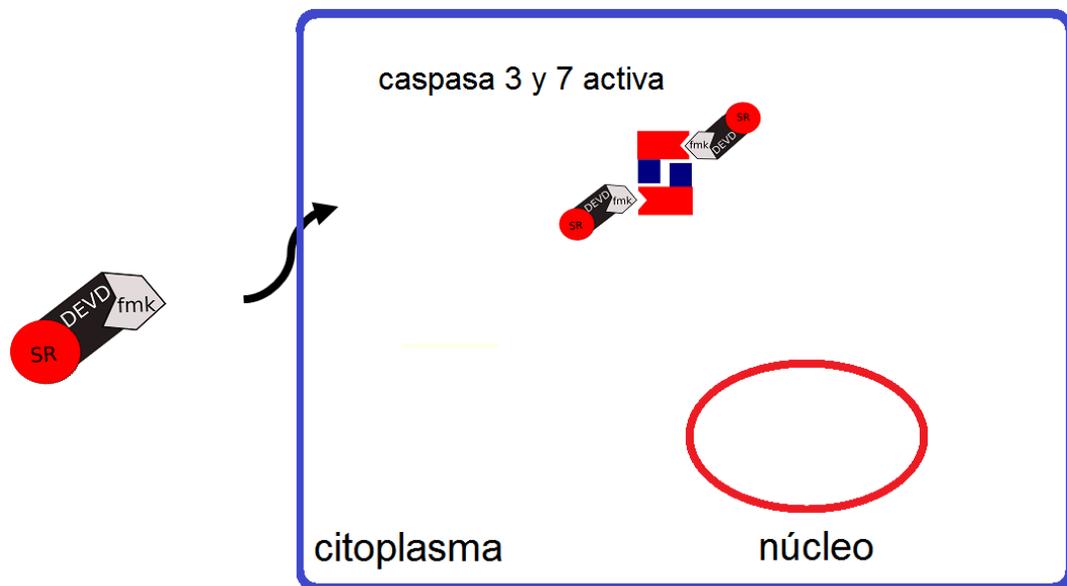


Figura 6. Mecanismo de acción del reactivo de FLICA.

3.4.2 NucView

NucView es un sustrato sintético, permeable a la membrana y no citotóxico, es utilizado para la detección de caspasas 3 y 7 activas, está conformado por dos compuestos: el primero es el péptido DEVD que las caspasas 3 y 7 activas reconocen y dividen; el segundo de nombre NucView 488, que es un derivado del agente intercalador de ADN naranja de tiazol, el cual se une a la cadena doble de ADN. El naranja de tiazol por sí solo no es fluorescente hasta que se une al ácido nucleico (Figura 7). Las caspasas 3 y 7 activas reconocen al péptido y lo dividen, el fragmento que tiene NucView emigra hacia al núcleo. Con este reactivo no se identifica el sitio donde la caspasa 3 y 7 está activa (Cen *et al.*, 2008).

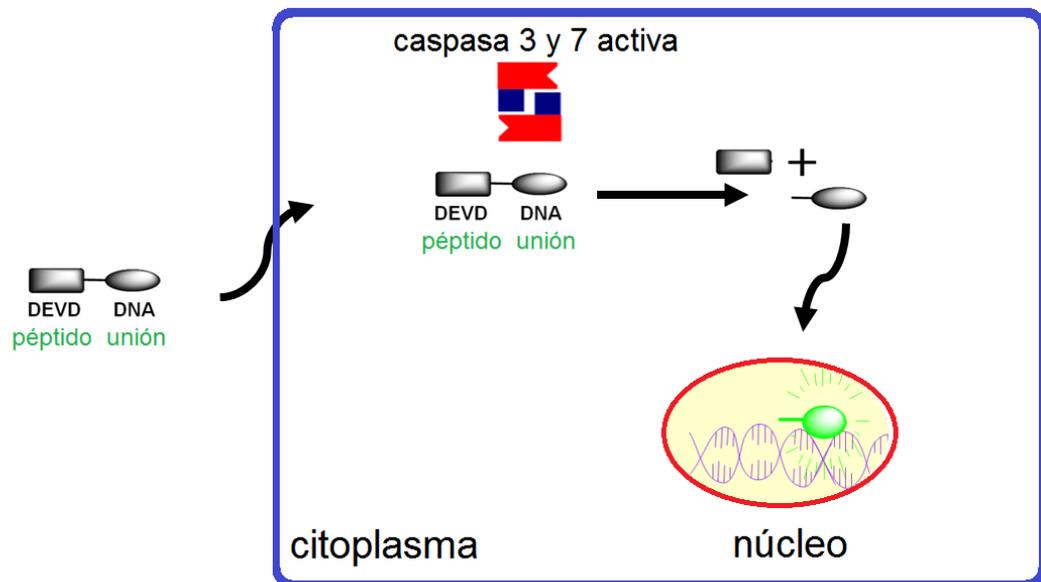


Figura 7. Mecanismo de acción del reactivo de NucView

3.5 Otros tipos de muerte celular: la necrosis, la autofagia y otras variaciones de la muerte celular

El término necrosis proviene del griego *nekros* que significa cadáver y usualmente es empleado para describir la muerte celular no regulada y descontrolada producto de una lesión que afecta un gran número de células. Morfológicamente, la necrosis es caracterizada por la vacuolización del citoplasma, el rompimiento de la membrana plasmática y la inducción de inflamación alrededor de células periféricas provocando la muerte descontrolada en células adyacentes; los receptores TNFR, FasR, TRAILR se han observado durante este fenómeno (Edinger y Thompson, 2004). Durante la necrosis, la célula libera enzimas lisosomales, que empiezan por fragmentar el núcleo (cariorraxis) y pérdida progresiva del material nuclear (cariólisis) (Kanduc *et al.*, 2002).

El término autofagia proviene del griego *autos* que significa por sí mismo y *phagos* que significa comer y literalmente significa auto comerse por sí mismo. La autofagia es estimulada por la ausencia de energía, y se caracteriza morfológicamente por la vacuolización del citoplasma, pérdida de condensación de la cromatina, bioquímicamente se caracteriza por el secuestro de proteínas y orgánulos como la mitocondria, degradados como una fuente de energía; no involucra la activación y acción de caspasas (Kanduc *et al.*, 2002) (Cuadro 2).

La necrosis también se ha propuesto que puede ser un proceso regulado y controlado, a este tipo de muerte celular se ha definido como necroptosis, aunque el mecanismo aún es desconocido, se ha descrito que la necroptosis combina características de la apoptosis y la necrosis, es iniciada por la unión de un ligando de muerte (TNR α) a su receptor correspondiente (TNFR), incrementando el número de receptores en la membrana plasmática, durante este fenómeno se ha observado la participación de la RIP1, RIP3, la inhibición de las caspasas, permeabilidad de complejo del poro de transición de la membrana, producción de ERO,

permeabilización de la membrana lisosomal (Kroemer *et al.*, 2009; Vandenabeele *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Tipos de muerte celular y sus características morfológicas modificado de (Kroemer *et al.*, 2009).

Tipo de Muerte Celular	Características morfológicas
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> Reducción del volumen celular y nuclear (picnosis) Fragmentación Nuclear (cariorrhexis) Formación de burbujas en la membrana Pérdida de adhesión con células periféricas Formación de cuerpos apoptóticos Modificaciones menores de los organelos en el citoplasma
Autofagia	<ul style="list-style-type: none"> Pérdida de la condensación de la cromatina Vacuolización masiva del citoplasma Acumulación de vacuolas autofágicas
Cornificación	<ul style="list-style-type: none"> Eliminación de organelos citosólicos Modificación de la membrana plasmática Extrusión de lípidos en el espacio extracelular Pérdida de corneocitos
Necrosis	<ul style="list-style-type: none"> Hinchazón del citoplasma Ruptura de la membrana plasmática Hinchazón de los orgánulos del citoplasma Condensación moderada de la cromatina

4. ANTECEDENTES

4.1 Las caspasas y su relación con los espermatozoides de humanos

Los primeros estudios que describieron características de la apoptosis en las células germinales testiculares y en los espermatozoides eyeculados datan a finales de los años 90 (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1999; Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Sakkas *et al.*, 1999; Sinha-Hikim *et al.*, 1998). Los marcadores de apoptosis que se han utilizado en células somáticas, también se han usado en los espermatozoides de hombres y de otros mamíferos no humanos, entre los cuales se incluyen: la expresión de los genes Bax, Bcl-2, Fas (Cayli *et al.*, 2004, el cambio en el potencial de la membrana mitocondrial (Marchetti *et al.*, 2002), las caspasas activas (Grunewald *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2012; Paasch *et al.*, 2004; Pichardo *et al.*, 2010; Weng *et al.*, 2002) y la condensación de la cromatina y la fragmentación de ADN (Sakkas *et al.*, 2002).

Las caspasas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 se han detectado en los espermatozoides vivos eyaculados de hombres fértiles e infértiles y en otros mamíferos (Sakkas *et al.*, 2000; Zalata *et al.*, 2011). En la literatura no se ha documentado la función de las caspasas en los espermatozoides (Taylor *et al.*, 2004); aunque algunos autores sugirieron que los eventos de la apoptosis en los espermatozoides eyaculados de seres humanos podría corresponder a una de las vías de activación de las caspasas, como sucede en células somáticas (Marchetti y Marchetti, 2009).

Estos mismos autores (2007) sugirieron que el marcaje de las caspasas en los espermatozoides puede contribuir al diagnóstico de la condición de fertilidad del macho, que puede tener un valor predictivo durante la fertilización en condiciones *in vivo* o *in vitro*, que puede ser considerado como indicadores de daño en los

espermatozoide inducido por ambientes tóxicos o manipulación del semen y que su ausencia podría contribuir al éxito de la fertilización.

A pesar de que se desconoce la función de las caspasas activas en los espermatozoides, su presencia se ha correlacionado con algunos indicadores de la calidad espermática, por ejemplo, hombres diagnosticados con infertilidad primaria y con movilidad espermática baja, presentan mayor porcentaje de espermatozoides que expresan la caspasa 3 activa con respecto a hombres diagnosticados como fértiles y con movilidad espermática baja; en este estudio, la caspasa activa se localizó particularmente en la pieza media en espermatozoides normales y en espermatozoides anormales (Weng *et al.*, 2002).

Por su parte, Kotwicka (2008) reportó que la caspasa 3 activa se correlaciona negativamente con la movilidad espermática; ella observó que cuando se separa el eyaculado en alícuotas sin algún tratamiento o alícuotas de semen con movilidad espermática alta; el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas con movilidad alta disminuye con respecto al porcentaje de los espermatozoides que expresan la caspasa 3 activa de alícuotas de semen neto. Por otro lado, los pacientes (espermiograma anormal) presentaron mayor porcentaje de espermatozoides con caspasa 3 activa con respecto a los donadores (Marchetti *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2004).

También se ha observado que la calidad espermática está relacionada con la condición de salud, por ejemplo, los hombres diagnosticados con varicocele y con oligoastenoteratozoospermia presentan mayor porcentaje de espermatozoides que expresa caspasa 9 activa comparado con hombres saludables y con oligoastenoteratozoospermia (Zalata *et al.*, 2011). La presencia de la caspasa 3 activa en los espermatozoides también se han relacionado con hombres que tienen diabetes tipo 1 y tipo 2 (Ressner *et al.*, 2012).

En especies de interés pecuario la presencia de las caspasas activas se ha utilizado como indicadores de la calidad espermática. Por ejemplo, los espermatozoides de borrego con movilidad alta que fueron separados por “swim-up” presentan un porcentaje mayor de espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas con respecto a los espermatozoides con movilidad baja (Pichardo *et al.*, 2010). Sin embargo, en los espermatozoides de hombres se observó lo contrario (Almeida *et al.*, 2005).

El manejo de las muestras de semen se ha relacionado con el incremento en la expresión de caspasas activas en los espermatozoides muestras espermáticas. Se ha descrito que la incubación de muestras espermáticas de borrego después de una hora, el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas se incrementa a temperatura ambiente (García *et al.*, 2012).

El uso de gradientes de Percoll, en muestras espermáticas de caballo incrementan el porcentaje de los espermatozoides que expresan la caspasa 3 activa en subpoblaciones de baja densidad con respecto a las subpoblaciones de alta densidad respectivamente (Brum *et al.*, 2008). En el cuadro tres se muestra las principales especies donde se ha evaluado la expresión de las caspasas activas en los espermatozoides mediante por substratos fluorogénicos y evaluados en CF y/o MF.

Cuadro 3. Expresión de caspasas activas en los espermatozoides de especies de interés pecuario.

Referencia/Año	Especie	Caspasa	Efecto o condición
Anzar <i>et al.</i> ,2002	Bovinos	3	Existen diferencias en los porcentajes de los espermatozoides que expresan la caspasa 3 entre los individuos de la misma especie.

Brum <i>et al.</i> , 2008	Equinos	3	La criopreservación incrementa el porcentaje de los espermatozoides que expresan la caspasa 3
Marti <i>et al.</i> , 2008		3	El choque térmico incrementa el porcentaje de los espermatozoides que expresan la caspasa 3. Las caspasas 3 se localizaron en la región apical, equatorial, post-acrosomal y en el flagelo mediante inmunotinción
Pichardo <i>et al.</i> , 2010	Ovinos	3 y 7	Existen diferencias en los porcentajes de los espermatozoides que expresan la caspasa 3 y 7 entre los eyaculados de un mismo individuo. Las caspasas se localizaron en la pieza principal, en la pieza media, en la fosa de implantación, en la región post-acrosomal.
García <i>et al.</i> , 2012		3 y 7	La incubación de semen a temperatura ambiente incrementa los porcentajes de los espermatozoides que expresan la caspasa 3 y 7
Morales <i>et al.</i> , 2012	Porcinos	3 y 7	La subpoblación espermática que presentó mayor movilidad espermática tiene un porcentaje mayor de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas.

4.2 Las caspasas activas en los espermatozoides y su relación con la fertilización

Algunos autores sugieren que las caspasas activas podría tener una relación directa con la fertilización (Taylor *et al.*, 2004). En este sentido, se ha observado que los espermatozoides de hombres sanos que expresan la caspasa 3 activa en muestras separadas de acuerdo a la movilidad, el porcentaje de los espermatozoides que

expresaron la caspasa 3 activa se correlaciona negativamente con la tasa de fertilización *in vitro* (Marchetti *et al.*, 2004). También se ha observado que el porcentaje de espermatozoides que expresan la caspasa 3 activa se correlaciona negativamente con la tasa de penetración en el ovocito mediante la prueba de penetración de un ovocito de hámster libre de zona (Grunewald *et al.*, 2007).

4.3 Papel no apoptótico de la caspasa 3 en las células somáticas

Actualmente, existe evidencia de que la caspasa 3 participa en procesos no letales, se ha observado que la inhibición de la caspasa 3 de forma química o del silenciamiento del gen que expresa la caspasa 3, detiene la diferenciación de las células precursoras de eritroides (Galluzi *et al.*, 2012). Del mismo modo se ha observado que la caspasa 3 participa en la memoria, en la plasticidad de las neuronas y en alteraciones morfológicas en el cerebro (D'Amelio *et al.*, 2010). Así mismo, se ha documentado que la caspasa 3 activa participa en la diferenciación de la línea celular cancerígena derivada de células mielógenas crónicas (K562) a células eritroides (Sztiller-Sirkorska *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la caspasa 3 participa en la diferenciación de las espermátidas de la mosca *Drosophila Melanogaster* en un proceso denominado "individualización"; la caspasa 3 es la responsable de separar los compartimientos citoplasmáticos que culminan con la separación y diferenciación de los espermatozoides (Arama *et al.*, 2003).

5. Hipótesis

Si FLICA y NucView marcan lo mismo utilizando una estrategia diferente, entonces, esperamos que el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas no difiera significativamente cuando las muestras espermáticas sean sometidas a la inducción de apoptosis (IMQ) o inhibición no fluorescente (zDEVD-fmk) de las caspasas.

6. Justificación

La infertilidad masculina es una condición que afecta a humanos y a otras especies. En la literatura se ha documentado que los espermatozoides presentan caspasas activas, aunque su función es aún desconocida, existe la posibilidad de que las caspasas activas estén relacionadas con la fertilización.

7. Objetivos

7.1 General

Investigar la diferencia en el marcaje *in situ* (FLICA) o *ex situ* (NucView) de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata.

7.2 Específicos

Evaluar, mediante citometría de flujo, el marcaje de los espermatozoides de rata cuando se utiliza FLICA, NucView o ambos

Evaluar, mediante citometría de flujo, los espermatozoides de rata cuando se utiliza el inductor de apoptosis imiquimod (IMQ), el inhibidor de caspasas 3 y 7 activas (zDEVD-fmk) o ambos y marcados con FLICA, NucView o ambos

8. Material y Métodos

8.1 Diseño experimental

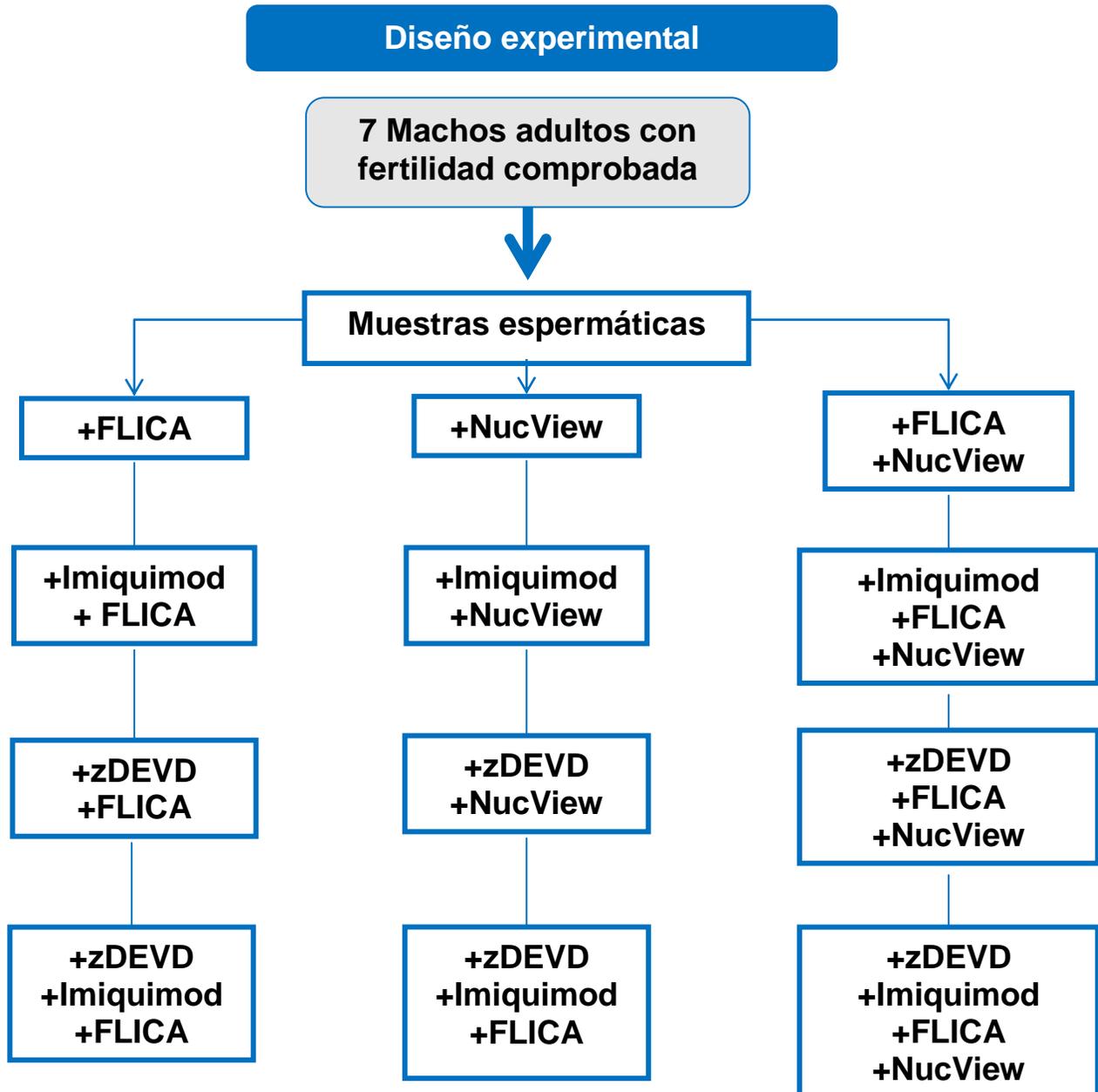


Figura 8. Diagrama de actividades del diseño experimental, cada cuadro en color azul representa un tratamiento independiente

8.2 Material Biológico

7 ratas macho (CII-ZV) de 90 días de edad, sexualmente maduros y con fertilidad comprobada, fueron separados y mantenidos bajo condiciones controladas de luz (luz desde las 5:00 am hasta las 19:00 pm) y una temperatura controlada (22 ± 2 °C). Los animales fueron colocados en cajas de acrílico bajo condiciones nutrimentales estándares (Purina, S.A., México) y agua *ad libitum* en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

8.3 Procedimiento para extracción de las muestras espermáticas

Las ratas se sacrificaron en una cámara de éter. Se realizaron los cortes necesarios para extraer los conductos deferentes. Los conductos deferentes fueron exprimidos con unas pinzas de relojero. La muestra espermática obtenida se diluyó en un tubo eppendorff precalentado a 37°C con 1mL de búffer Tyrodes (Sigma, St. Louis, Mo, USA). Las muestras espermáticas se homogenizó complemente e incubará a 37°C por 15 minutos. Las muestras espermáticas fueron separadas en alícuotas para análisis posteriores.

8.4 Detección de las caspasas 3 y 7 activas

8.4.1 FLICA

La actividad de las caspasas 3 o 7 activas se marcaron *in situ* con el reactivo SR-DEVD-FMK, de nombre comercial FLICA (Image-iT LIVE red caspase 3/7, Molecular Probes, Oregon, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, FLICA 150X stock fue diluida con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 37.5X. Una alícuota de 14.5 μ L de semen se incubó con 0.5 μ L del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos.

Para demostrar la especificidad de FLICA se realizaron los siguientes controles: el control positivo, conformado con la muestra espermática más imiquimod (Sigma, St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 1 μ M durante 20 minutos, después la alícuota fue procesada para detectar caspasas activas. El control negativo,

conformado con muestra espermática más 0.5 μL con el inhibidor zDEVD-fmk (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 20 minutos; el cual es un inhibidor permeable de la membrana. El inhibidor fue diluido en DMSO y se agregó a las muestras a una concentración final de 40 $\mu\text{mol/L}$, es permeable a la membrana y bloquea el sitio activo de las caspasas 3, 6, 7, 8 10 activas.

8.4.2 NucView

Las caspasas 3 o 7 activas se marcaron con el reactivo NucView 488 (Caspase-3 substrate for live cells, Biotium, Inc. Hayward, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una alícuota de 50 μL de semen se incubó con 0.5 μL del reactivo NucView 488 a una concentración final 1 μM por 30 minutos a temperatura ambiente. Para demostrar la especificidad de NucView se realizaron los siguientes controles: el control positivo fue por la incubación de la muestra espermática con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos y la muestra fue evaluada. El control negativo, alícuotas con muestra espermática fresca fueron incubadas con 0.5 μL con el inhibidor zDEVD-fmk por 20 minutos.

8.4.3 FLICA más NucView

Una alícuota de 14.5 μL de semen se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. Para demostrar la especificidad de FLICA más NucView se realizaron los siguientes controles: el control positivo fue por la incubación de la muestra espermática con Imiquimod a la concentración final de 1 μM durante 20 minutos y la muestra fue procesada. El control negativo, alícuotas con muestra espermática fresca fueron incubadas con 0.5 μL con el inhibidor zDEVD-fmk por 20 minutos.

8.4.4 Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA, zDEVD+FLICA, zDEVD+IMQ+FLICA

Tratamientos a cuatro alícuotas con muestra espermática. La primera alícuota de 14.5 μL de semen se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, finalmente la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con Imiquimod a la concentración final de 1 μM durante 20 minutos, se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, finalmente la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La tercera alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con 0.5 μL del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 $\mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, posteriormente fue procesada para detectar las caspasas activas. La cuarta alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con 0.5 μL del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 $\mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, finalmente la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas.

8.4.5 Espermatozoides de rata tratados con IMQ+NucView, zDEVD+NucView y zDEVD+IMQ+NucView

Tratamiento a cuatro alícuotas con muestra espermática. La primera alícuota de 50 μL de semen se incubó con 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda alícuota de 50 μL de semen fue incubada con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, se incubó con 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue procesada para detectar caspasas activas. La tercera alícuota de 50 μL de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μL del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40

$\mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, después se incubó con $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después fue procesada para detectar las caspasas activas. La cuarta alícuota de $50 \mu\text{L}$ de semen fue incubada con incubadas con $0.5 \mu\text{L}$ del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de $40 \mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, después fue incubada con imiquimod a una concentración final de $1 \mu\text{M}$ durante 20 minutos, se incubó con $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas.

8.4.6 Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA+NucView, zDEVD+FLICA+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView

Tratamiento a cuatro alícuotas espermáticas. La primera alícuota de $14.5 \mu\text{L}$ de semen se incubó con $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda alícuota de $14.5 \mu\text{L}$ de semen fue incubada con Imiquimod a una concentración final de $1 \mu\text{M}$ durante 20 minutos, después se incubó con $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La tercera alícuota de $14.5 \mu\text{L}$ de semen fue incubada con incubadas con $0.5 \mu\text{L}$ del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de $40 \mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, después se incubó con $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó $0.5 \mu\text{L}$ del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La cuarta alícuota de $14.5 \mu\text{L}$ de semen fue incubada con incubadas con $0.5 \mu\text{L}$ del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de $40 \mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, después

fue incubada con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, después se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas.

8.4.7 Espermatozoides de rata tratados con IMQ+FLICA, IMQ+NucView, IMQ+FLICA+NucView

Tratamiento a tres alícuotas con muestra espermática. La primera alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, después se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda alícuota de 50 μL de semen fue incubada con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, después se incubó con 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar caspasas activas. La tercera alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con Imiquimod a una concentración final de 1 μM durante 20 minutos, después se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas.

8.4.8 Espermatozoides de rata tratados con zDEVD+FLICA, zDEVD+NucView y zDEVD+FLICA+NucView

Tratamiento a tres alícuotas con muestra espermática. La primera alícuota de 14.5 μL de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μL del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 $\mu\text{mol/L}$ a temperatura ambiente por 20 minutos, después se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, después fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda

alícuota de 50 μ L de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μ L del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 μ mol/L a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con 0.5 μ L del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, se procesó para detectar las caspasas activas. La tercera alícuota de 14.5 μ L de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μ L del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 μ mol/L a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con 0.5 μ L del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó 0.5 μ L del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después la muestra fue procesada para detectar las caspasas activas.

8.4.9 Espermatozoides de rata tratados con zDEVD+IMQ+FLICA, zDEVD+IMQ+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView

Tratamiento a tres alícuotas con muestra espermática. La primera alícuota de 14.5 μ L de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μ L del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 μ mol/L a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con Imiquimod a una concentración final de 1 μ M durante 20 minutos, se incubó con 0.5 μ L del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, después fue procesada para detectar las caspasas activas. La segunda alícuota de 50 μ L de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μ L del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 μ mol/L a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con imiquimod a una concentración final de 1 μ M durante 20 minutos, se incubó con 0.5 μ L del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después fue procesada para detectar las caspasas activas. La tercera alícuota de 14.5 μ L de semen fue incubada con incubadas con 0.5 μ L del inhibidor zDEVD-fmk a una concentración final de 40 μ mol/L a temperatura ambiente por 20 minutos, se incubó con Imiquimod a una concentración final de 1 μ M durante 20 minutos, posteriormente se incubó con 0.5 μ L del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, en el minuto 15 de la incubación de FLICA se adicionó 0.5 μ L del reactivo

NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente, después se procesó para detectar las caspasas activas.

8.5 Cuantificación de los espermatozoides de rata con caspasas activas 3 y 7 por citometría de flujo

La detección de los espermatozoides positivos a caspasas 3 y 7 activas marcados con FLICA o NucView o ambos se evaluó mediante un citómetro de Flujo FACARIA II (Becton Dickson Immunocytometry BD BioSciences, San José, CA, USA) equipado con múltiples láseres, y fotodetectores que tienen capacidad directa para evaluar los parámetros de luz directa (forward light scatter) y luz lateral (side light scatter) en el laboratorio de citometría de flujo en Área de Estudios Multidisciplinarios de la FES Zaragoza, UNAM. Los datos de 10,000 eventos se colectaron en el software (BD FACSDiva Versión 6.0, BD BioSciences, San José California, USA). Los datos se analizaron con el software WinList 3.2 (Verity Software House Inc. Topsham, Maine, USA) en una computadora con sistema operativo Windows XP. La información recolectada del citómetro de flujo fue reportada de acuerdo a *Lee et al.*, (2008) (cuadro 4).

8.6 Observación de los espermatozoides de rata marcados con FLICA o NucView o ambos por microscopia de fluorescencia

Tratamiento a tres alícuotas con muestra espermática. Una alícuota no fue incubada con FLICA o NucView o Ambos. La segunda alícuota de 14.5 μL se incubó con 0.5 μL del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 minutos, después fue procesada para detectar las caspasas activas. La tercera alícuota de 50 μL de semen se incubó con 0.5 μL del reactivo NucView 488 por 30 minutos a temperatura ambiente. Las micrografías fueron obtenidas del Microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Tochigi, Japón) con el cubo de filtro para FICT y Texas Red conectada a una cámara CCD y capturadas con el software Nis Elements (Nikon versión 2.0, Kawasaki, Japan) a 40 y 100 aumentos en una computadora con sistema operativo Windows XP.

Cuadro 4. Información mínima en un trabajo de Citometría de Flujo de acuerdo a Lee *et al.*, 2008.

Información mínima para un trabajo experimental de Citometría de Flujo	
Experimento	<p>Propósito: Investigar si existe discrepancia entre los marcadores FLICA o NucView</p> <p>Variables del experimento: FLICA, NucView o ambos, IMQ, zDEVD, zDEVD+IMQ</p> <p>Control: muestra sin FLICA o NucView o ambos</p>
Muestra/ Especimen	<p>Material: 7 ratas macho adultas (CII-ZV) con fertilidad comprobada</p> <p>Lugar: Laboratorio citometría de flujo, FES Zaragoza, UNAM</p> <p>Tratamientos: FLICA, IMQ+FLICA, zDEVD+FLICA, zDEVD+IMQ+FLICA, NucView, IMQ+NucView, zDEVD+NucView, zDEVD+IMQ+NucView, FLICA+NucView, IMQ+FLICA+NucView, zDEVD+FLICA+NucView, zDEVD+IMQ+FLICA+NucView.</p> <p>Reactivo/Análisis/Detección: SR-DEVD-fmk, DEVD-ADN, zDEVD-fmk, IMQ. FLICA 530-560 ex/em; NucView 488-520 ex/em.</p>
Análisis de datos	<p>Datos: Porcentajes de espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7</p> <p>Compensación: FICT/PE-Texas-RED, solapamiento del umbral 61.11</p> <p>Voltaje: FSC 632; SSC 526; FICT 466; Texas-Red 542</p> <p>Estadística descriptiva: Prueba de ANOVA de una vía, post hoc de Tukey</p>
Detalles del instrumento	<p>Identificación del instrumento: FACS ARIA II</p> <p>Configuración de fluidos: Reserva de Fluidos 10 lts., contenedores limpiado y desechos, contenedores autolavables, Fluido FACSflow, Velocidad de flujo 3.0, Fluidos para lavado FACS Clean, FACS Rinse, etanol.</p> <p>Configuración óptica: Plataforma óptica ensablada para láseres.</p> <p>Láser clase IIIb para tamaño y complejidad, espejo elíptico, amplificación óptica, emparejamiento óptico, lente fluorescente para fluorescencia, apertura 1.2, filtros, detector de luz delantera, fotodiodo con un filtro de paso de banda de 488/10, fotomultiplicador de 488/10 filtro paso de banda y detectores fluorescentes, detección de 5 longitudes de onda con un láser de 488 nm: 515–545 nm FITC; 564–606 nm or 563-589 nm PE; 600–620 nm PE-Texas Red; 675–715 nm or 665-685 nm PE-Cy5 or PerCP or PI 750–810 nm PE-Cy7, detección de 2 longitudes de onda con un láser de 633-nm: 650–670nm APC; 750–810 nm APC-Cy7. Detección de 2 longitudes de onda con un láser de 407-nm: 515–545 nm Alexa Fluor 430/Am y Cyan 430–470 nm Pacific Blue o DAPI or Hoechst.</p> <p>Configuración electrónica: PC con al menos Pentium 4 con 3.0 GHz o posterior, 2 GB RAM, discos duros de 40 GB y 160 GB, 16x DVD +/- RW, de doble capa, Networking 10/100/1000 Ethernet, FireWire, 2 Monitores 19-pulgadas LCD, 2560 x 1024 resolución (estándar), impresora de inyección a color, archivos Flow Cytometry Standard (FCS) versión 2.0, Software BD FACSDiva TM software for the BD FACSAria cell sorter y WintList 3.2</p>

9. Estadística

Para todos los resultados la prueba de Kolmogorov-Smirnov se usó para determinar la normalidad. Los porcentajes de los espermatozoides que expresaron caspasas 3 y 7 activas se compararon mediante un análisis de varianza de una vía, considerando el tipo de marcaje como factor. Como prueba *post hoc* se utilizó Tukey. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. Todos los datos fueron analizados con el software R 2.15 (R Core Team, 2013) en una PC con el OS Fedora 20 KDE.

10. Resultados

10.1 Marcaje individual de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata por FLICA o NucView

El marcaje de caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata fue realizado con los reactivos NucView o FLICA. En la figura 9 se muestran los histogramas representativos de la incubación de las alícuotas que no fueron marcadas con FLICA o NucView, nombradas como control y alícuotas espermáticas tratadas con el inductor de apoptosis imiquimod (IMQ), el inhibidor (zDEVD-fmk), el inhibidor más el inductor (zDEVD.IMQ) y marcadas con el reactivo de FLICA (A) o NucView (B). El eje de la “X” muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias logarítmicas, el eje de la “Y” muestra el número de espermatozoides. En el control, se observa un histograma cercano al origen del plano, cuando el reactivo de FLICA o NucView fue adicionado el histograma se recorrió hacia la derecha, mostrando dos picos, una población no marcada y una población marcada. Cuando se adicionó el reactivo IMQ a las muestras y se marcaron con FLICA o NucView el histograma se desplazó a la derecha de las muestras incubadas con FLICA o NucView. Cuando se utilizó el inhibidor zDEVD–fmk, y se marcaron las muestras con FLICA o NucView, se observó una reducción de la intensidad de fluorescencia. Se utilizó el inhibidor más el inductor con la finalidad de activar las caspasas inactivas en los espermatozoides que no habían expresado las caspasas 3 y 7.

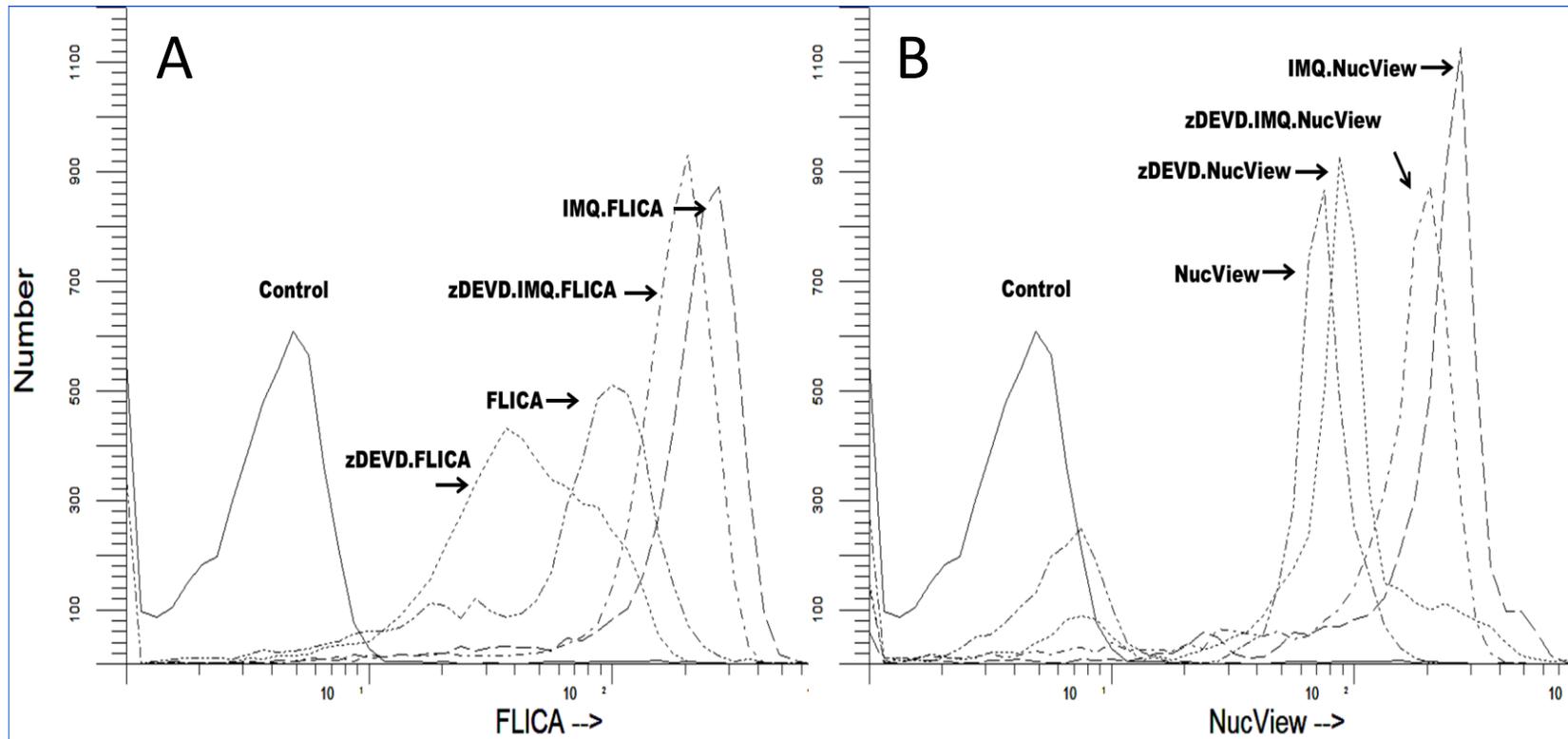


Figura 9. Histogramas representativos de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas marcados con FLICA (A) y NucView (B). Alícuotas incubadas con FLICA: control (muestra sin fluorescencia), control positivo (muestra más imiquimod más FLICA), control negativo (muestra más inhibidor zDEVD-fmk más imiquimod más FLICA). El inhibidor zDEVD-fmk se agregó 20 minutos antes de imiquimod, después se adicionó FLICA. Alícuotas incubadas con NucView: control (muestra sin fluorescencia), NucView (muestra más NucView), control positivo (muestra más imiquimod más NucView), control negativo (muestra más inhibidor zDEVD-fmk más imiquimod más NucView). IMQ, imiquimod. El eje de la “X” muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias logarítmicas, el eje de la “Y” muestra el número de espermatozoides.

10.2 Marcaje de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata por FLICA más NucView.

El marcaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas fue realizado con FLICA más NucView, al que nos referimos en adelante como “Dual”, se identificaron cuatro subpoblaciones (B): 1) espermatozoides que son reconocidos por NucView en color verde, (NucView+/FLICA-), 2) espermatozoides que son reconocidos por NucView y FLICA en color amarillo (NucView+/FLICA+), 3) espermatozoides que no fueron reconocidos por NucView o FLICA en color negro (NucView-/FLICA-), 4) espermatozoides que son reconocidos por FLICA en color rojo (NucView-/FLICA+). En la figura 10 se muestran los citogramas representativos de muestras sin fluorescencia (A) y muestras espermáticas incubadas con FLICA más NucView (B), adicionalmente se observan las muestras espermáticas que sólo fueron marcadas con FLICA (C) o marcadas con NucView (D).

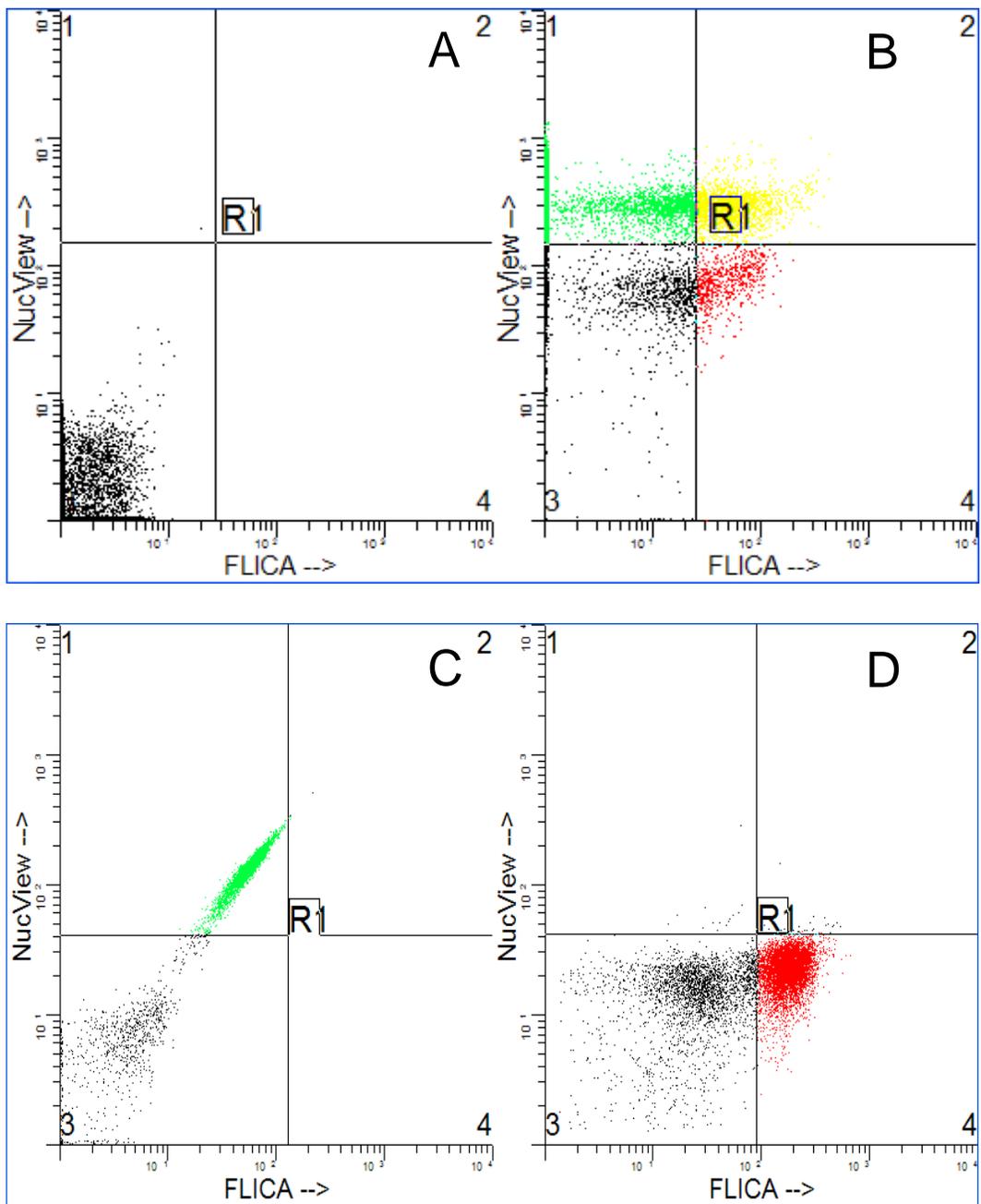


Figura 10. Citogramas representativos de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas de las muestras evaluadas con FLICA más NucView (B), comparadas con la muestra sin fluorescencia (A) y con las muestras de FLICA (C) y NucView (D). Los puntos en color negro representan los espermatozoides que no presentan fluorescencia NucView-/FLICA-, los puntos en color verde representan los espermatozoides NucView+/FLICA-, los puntos en color amarillo representas los espermatozoides NucView+/FLICA+, los puntos en color rojo representan los espermatozoides NucView-/FLICA+.

10.3 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA, NucView o ambos.

Los porcentajes de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 marcadas con FLICA o NucView no se modifican significativamente en las alícuotas evaluadas. Sin embargo, el porcentaje de los espermatozoides marcados con FLICA o NucView es mayor y difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides con marcaje dual (Figura 11).

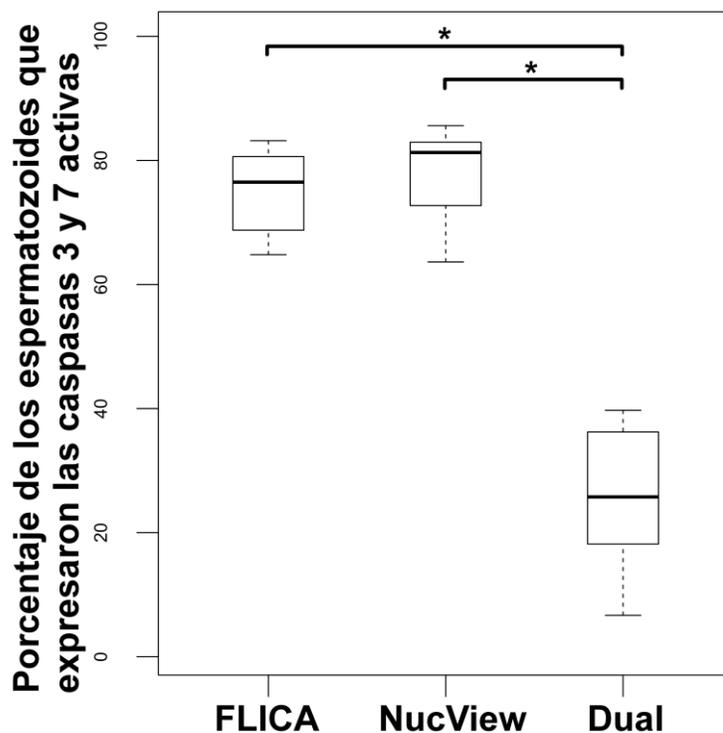


Figura 11. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas *in situ* o *ex situ* o ambos. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, la línea dentro de la caja representa la mediana o cuartil 2, la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.4 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA y sus diferentes tratamientos

El porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas marcados con FLICA es menor y difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides marcados con IMQ+FLICA. Pero el porcentaje de los espermatozoides marcados con FLICA es mayor y con significancia de los espermatozoides marcados con zDEVD+FLICA. También se observó que el porcentaje de espermatozoides marcados con IMQ+FLICA es mayor y difiere significativamente del porcentaje de espermatozoides marcados con zDEVD+FLICA (Figura 12).

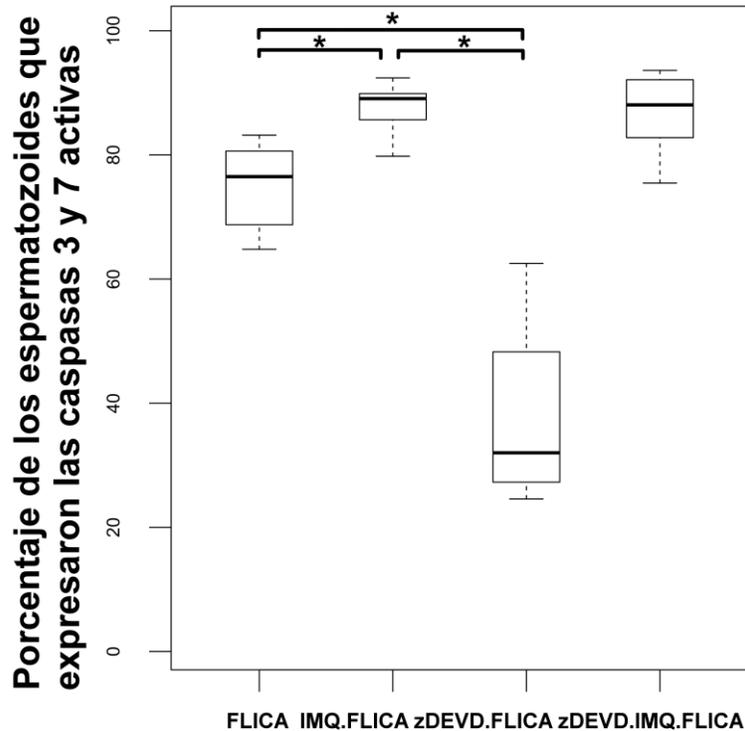


Figura 12. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas *in situ*. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, la línea dentro de la caja representa la mediana o cuartil 2, la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.5 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con NucView y sus diferentes tratamientos

El porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas marcados con NucView es menor y difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides marcados con IMQ+NucView (Figura 13).

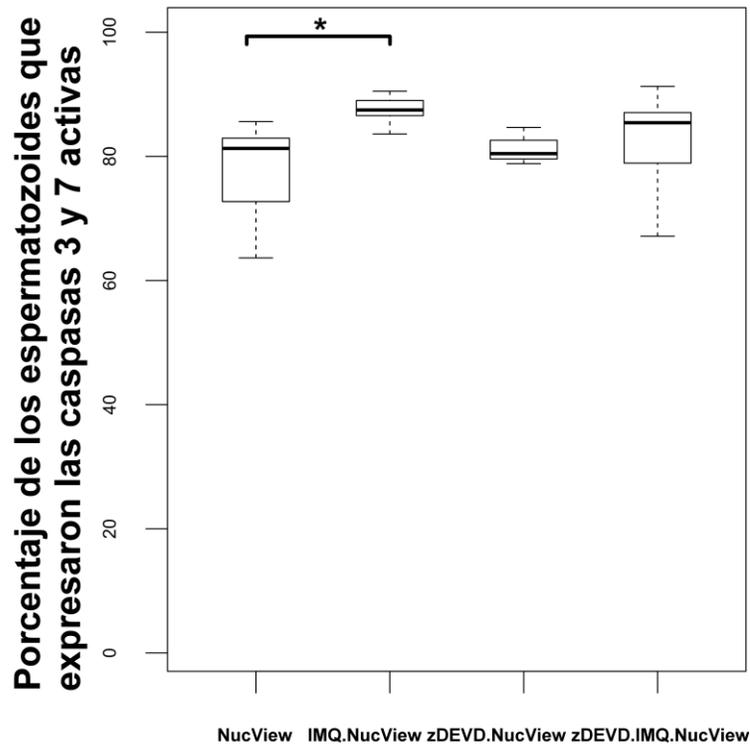


Figura 13. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas *ex situ*. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, el cuadrado negro representa la mediana o cuartil 2, del cuadrado negro a la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.6 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con FLICA+NucView y sus diferentes tratamientos

El porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas marcados con FLICA+NucView (Dual) es menor y difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides marcados con IMQ+Dual, del porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVd+Dual, del porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVd+IMQ+Dual. También se observó que el porcentaje de los espermatozoides marcados con IMQ+Dual es mayor y difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVd+Dual (Figura 14).

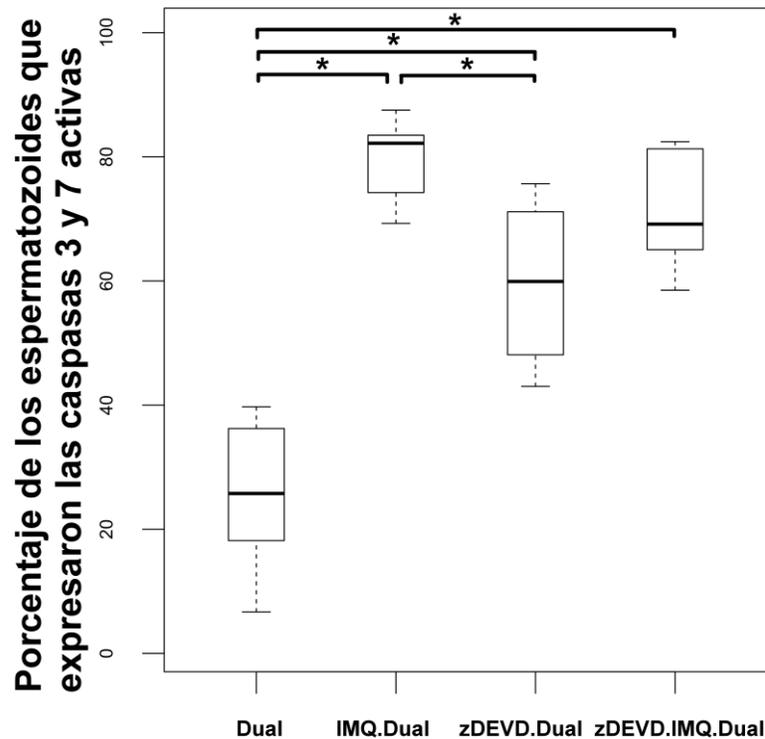


Figura 14. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas en un marcaje dual. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, la línea dentro de la caja representa la mediana o cuartil 2, la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.7 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con IMQ+FLICA, IMQ+NucView e IMQ+FLICA+NucView

La intensidad de fluorescencia de NucView o FLICA fue más alta cuando se adicionó IMQ con respecto al resto de los tratamientos. El porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas y marcadas con IMQ+FLICA e IMQ+NucView no difieren significativamente, pero ambos presentaron un porcentaje mayor y con significancia del porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 IMQ+Dual (Figura 15).

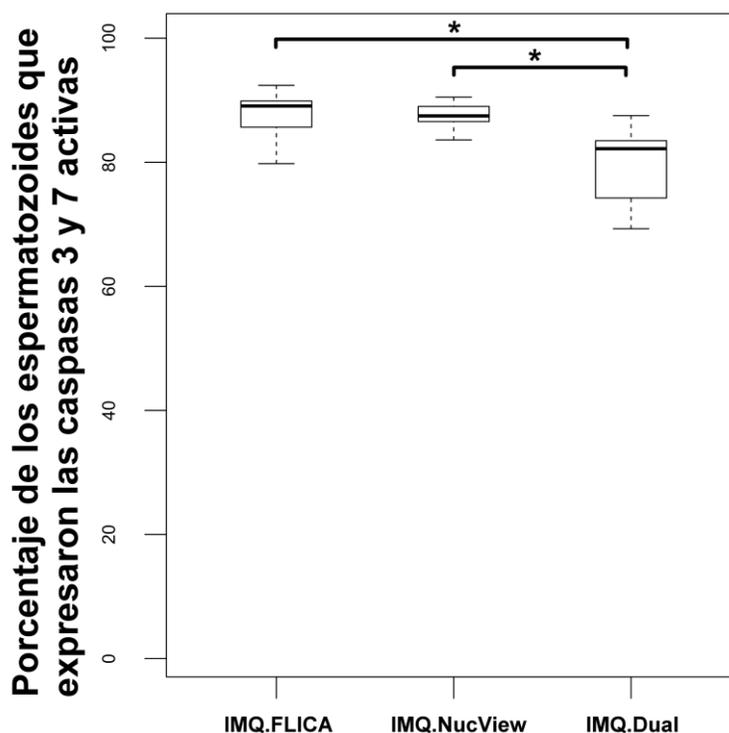


Figura 15. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con IMQ. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, la línea dentro de la caja representa la mediana o cuartil 2, la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.8 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con zDEVD+FLICA, zDEVD+NucView, zDEVD+FLICA+NucView

El inhibidor zDEVD-fmk fue usado como bloqueador del sitio activo de las caspasas 3 y 7 activas. El porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVD más FLICA difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVD más NucView, mientras que el porcentaje de los espermatozoides marcados con el inhibidor zDEVD más NucView difiere significativamente del porcentaje de los espermatozoides que expresaron las caspasas activas marcadas con zDEVD más FLICA+NucView (Figura 16).

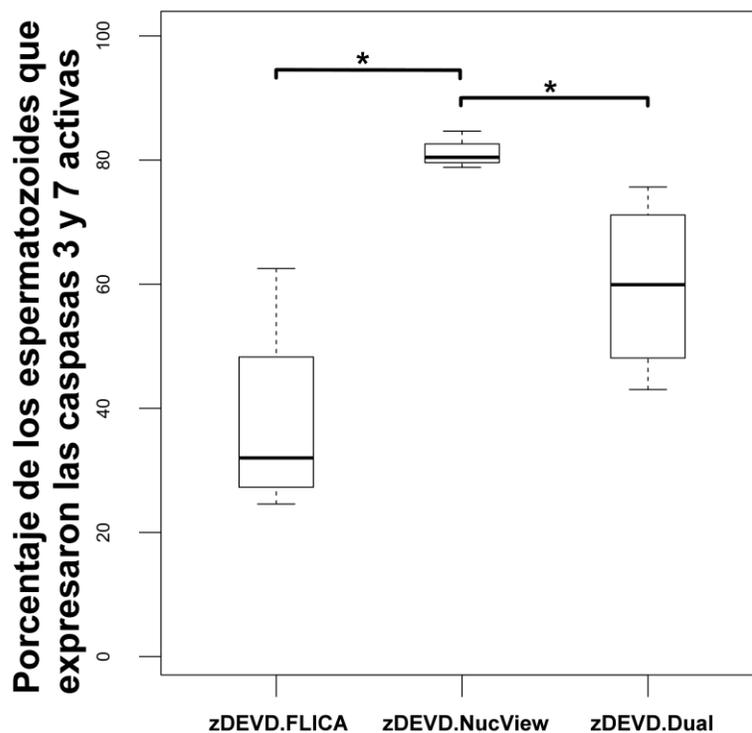


Figura 16. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con el inhibidor zDEVD-fmk. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, el cuadrado negro representa la mediana o cuartil 2, del cuadrado negro a la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.9 Distribución de los porcentajes de los espermatozoides de rata que expresaron caspasas 3 y 7 activas con zDEVD+IMQ+FLICA, zDEVD+IMQ+NucView y zDEVD+IMQ+FLICA+NucView

El reactivo zDEVD fue utilizado como bloqueador no fluorescente del sitio activo de las caspasas 3 y 7, mientras que IMQ fue utilizado como inductor de caspasas activas. El porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVD+IMQ+FLICA presenta un porcentaje y con significancia con respecto al porcentaje de los espermatozoides marcados con zDEVD+FLICA+NucView (Figura 17).

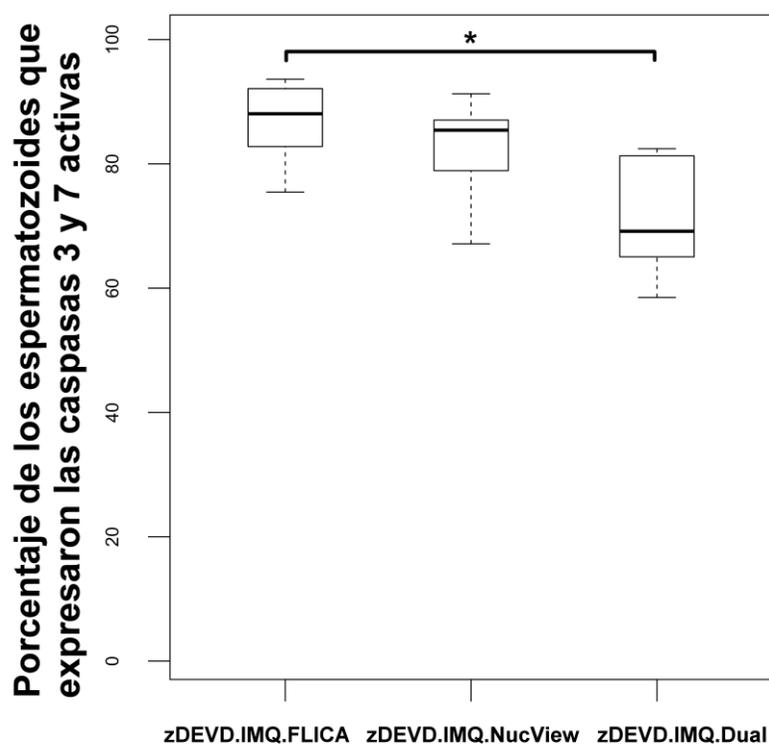


Figura 17. Distribución de los porcentajes de los espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas incubadas con el inhibidor zDEVD-fmk más imiquimod. El asterisco sobre la línea indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Las cajas representan el 75% de las observaciones, de la parte inferior de la caja al cuadrado negro representa el cuartil 1, el cuadrado negro representa la mediana o cuartil 2, del cuadrado negro a la parte superior de la caja representa el cuartil 3, las líneas que salen de las cajas representan el valor máximo y mínimo.

10.10 Detección de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata marcados con FLICA o NucView por microscopía de fluorescencia

La detección de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata se corroboró por microscopía de fluorescencia. En la figura 18 se muestran los espermatozoides que no fueron marcados con NucView o FLICA (A y B), espermatozoides que fueron positivos al reactivo de NucView (C y E) y espermatozoides positivos a FLICA (E y F).

En la figura 19, se corroboró la detección de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata marcados con FLICA+NucView. En la micrografía 20B se observan varios espermatozoides marcados con FLICA, mientras que en la micrografía 20C se observan espermatozoides marcados con NucView. Sin embargo, en la micrografía 20B se muestra un espermatozoide que fue negativo a FLICA pero fue positivo al reactivo de NucView (asterisco).

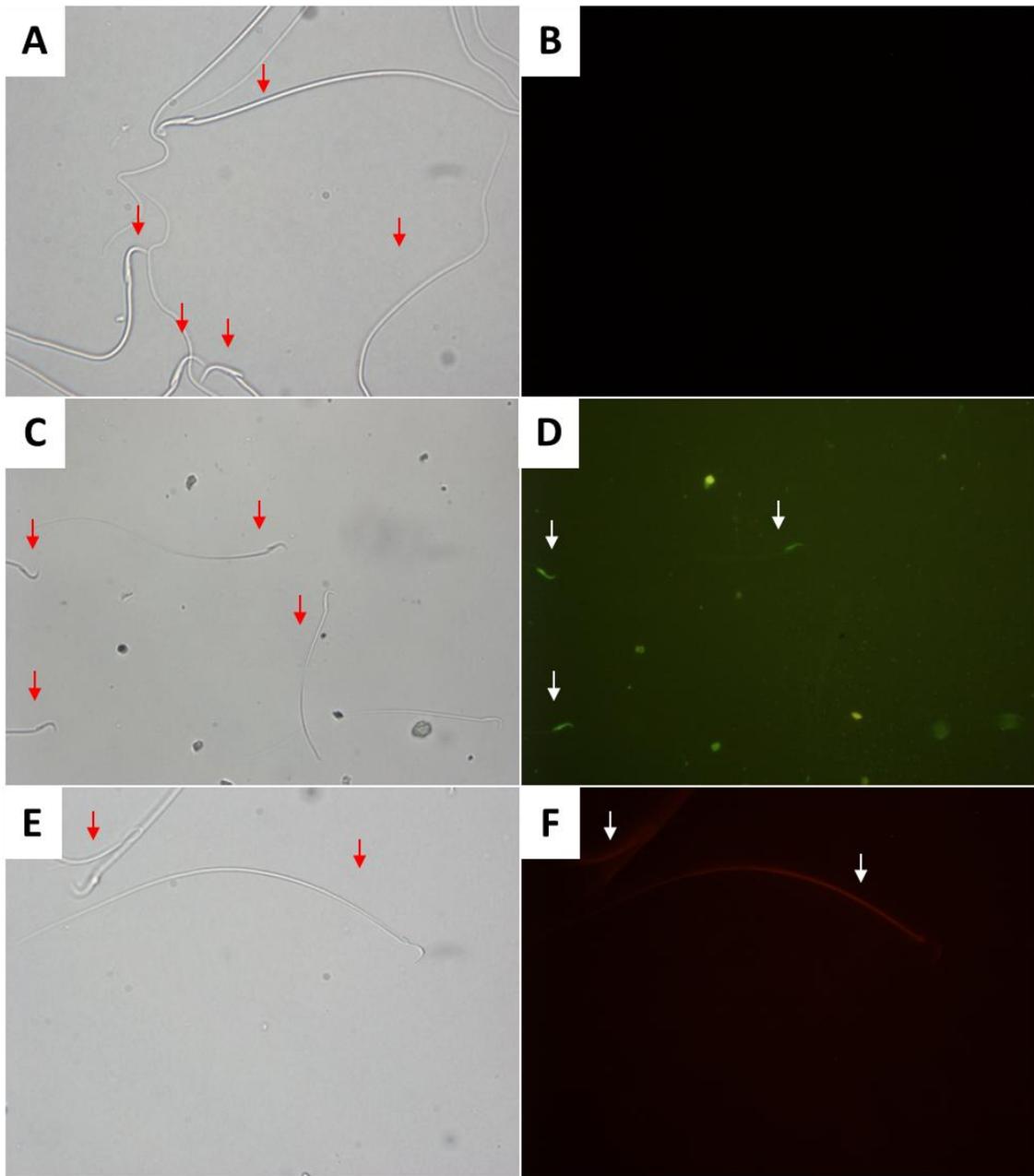


Figura 18. Micrografías de los espermatozoides sin fluorescencia (a) campo claro, (b) campo de fluorescencia.400X. Micrografías de los espermatozoides incubados con NucView (c) campo claro, (d) campo de fluorescencia. 200X. Micrografías de los espermatozoides incubados con FLICA (e) campo claro, (f) campo de fluorescencia (400X).

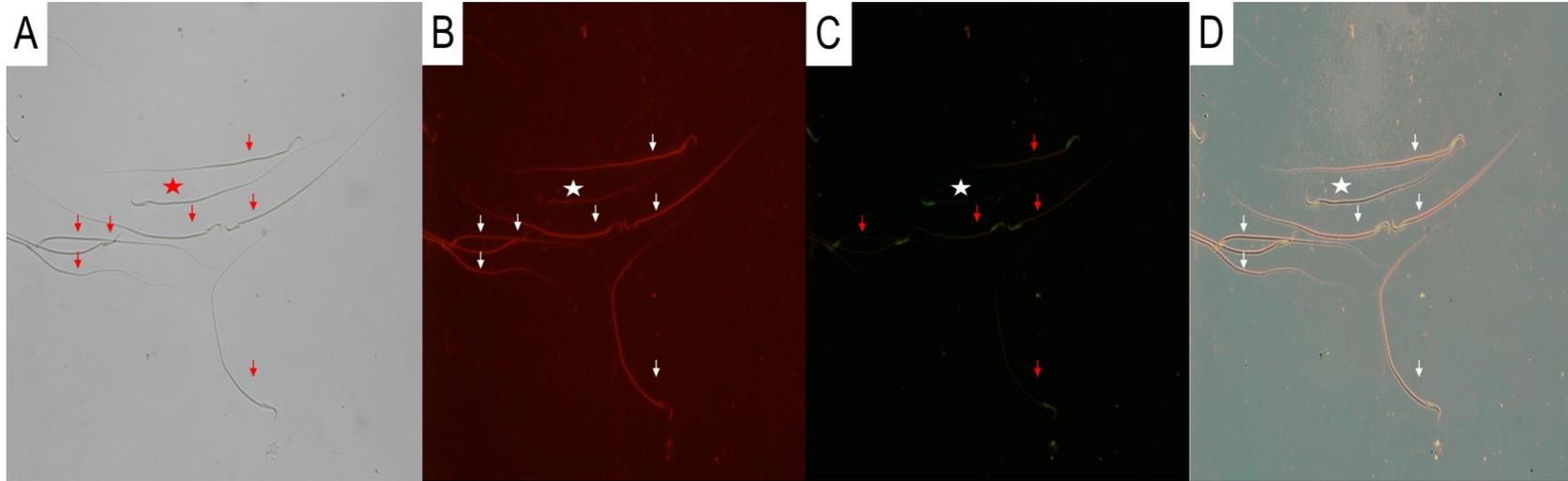


Figura 19. Micrografías de espermatozoides incubados con FLICA y NucView, campo claro (A), mismo campo para fluorescencia para FLICA (B), mismo campo para fluorescencia de NucView (C) y superposición de las imágenes D (A, B y C) . El asterisco muestra un espermatozoide que no es marcado por el reactivo de FLICA, pero es marcado por NucView 200X.

11. Discusión

La activación de las caspasas ejecutoras es una característica bioquímica de la apoptosis (Amstad *et al.*, 2001), se ha asumido que la apoptosis es frecuentemente considerada dependiente de caspasas, pero el Comité de Nomenclatura en la Muerte Celular, NCCD (por sus siglas en inglés, Nomenclature Committee on Cell Death) propuso el reemplazó de la frase “porcentaje de apoptosis” por la frase “porcentaje de células que expresan algún (os) aspecto (s) bioquímico (s) de la muerte celular” (Kroemer y Martin, 2005). El NCCD fue creado con la finalidad de unificar criterios en la definición de la muerte celular y sus diferentes morfologías. (Kroemer *et al.*, 2009). En las células somáticas, células germinales testiculares el marcaje de las caspasas activas o la división de sus sustratos son suficientes para definir la apoptosis (Kroemer *et al.*, 2009), además la caspasa 3 ejecutora se ha relacionado con procesos no letales (D’Amelio *et al.*, 2010; Lamkanfi *et al.*, 2007).

En este trabajo nosotros comparamos los porcentajes de los espermatozoides de rata que fueron marcados por dos sustancias fluorogénicas, NucView y FLICA y evaluadas por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. Los reactivos de FLICA, NucView y zDEVD-fmk son permeables a la membrana, no tóxicos y permanecen en la célula después de haber sido reconocidos por la caspasa activa, se han utilizado en la detección de apoptosis en células somáticas (Graham *et al.*, 1999; Cen *et al.*, 2008), en los espermatozoides (Morales *et al.*, 2013). Éste es el primer estudio que utiliza el reactivo de NucView en muestras espermáticas de rata para evaluar los porcentajes de espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas y es positivos después de ser incubados por 45 minutos con FLICA y son positivos después de ser incubados por 30 minutos con NucView, en nuestros resultados no se observaron diferencias significativas de los

espermatozoides que expresaron las caspasas 3 y 7 activas, esto nos permite sugerir que el marcaje de las caspasas con FLICA y NucView puede ser utilizado individualmente. El porcentaje de los espermatozoides de rata que expresan las caspasas 3 y 7 activas de ratas marcados con FLICA o NucView es alto comparados con los valores de otras especies; por ejemplo, en los espermatozoides de humano el porcentaje de espermatozoides que expresan caspasas 3 y 7 activas con NucView se encuentra el intervalo de entre 1 y 30% (Kotwica, 2008), mientras que cuando se utiliza FLICA los porcentajes se encuentran entre 1 y 44% (Grunewald *et al.*, 2007), estas diferencias podrían deberse a la genética de la especie y condición de los individuos.

Los espermatozoides eyaculados y los espermatozoides colectados del epidídimo de algunas especies de interés pecuario ya expresan las caspasas activas, por ejemplo, se ha reportado en los espermatozoides de cerdo, borrego y toro, el porcentaje de los espermatozoides marcados con FLICA, se encuentra entre el intervalo 10 al 75 (García *et al.*, 2012; Pichardo *et al.*, 2010; Martí *et al.*, 2008; Molares *et al.*, 2013). Los porcentajes de espermatozoides con expresión de caspasas son variables, entre individuos de la misma especie (Anzar *et al.*, 2002), y existe variación entre los eyaculados de un mismo individuo (Pichardo *et al.*, 2010). Una explicación para este fenómeno es que probablemente sea por la especie en estudio o el manejo de las muestras espermáticas, como el uso de gradientes de centrifugación u el medio utilizado.

En nuestro trabajo, empleamos el reactivo IMQ, debido que induce un incremento estable de espermatozoides positivos a FLICA y NucView. Cuando las muestras espermáticas fueron tratadas con IMQ, y marcadas con FLICA o NucView el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas activas se incrementa significativamente pero no difiere entre FLICA y NucView, esto nos permite sugerir que los espermatozoides que no tenían caspasas activas se fueron activando activación *de novo* de las caspasas. El IMQ es utilizado como inductor de apoptosis

en melanocitos de humanos (Kim *et al.*, 2010). A pesar de que no se conoce el mecanismo de acción de IMQ, se sabe que es un inductor de apoptosis en células cancerígenas, es un reactivo permeable a la membrana, y que probablemente este promueva la producción de ERO, liberación de citocromo C y consecuente activación *de novo* de las caspasas 3 y 7 activas por la vía intrínseca (Kim *et al.*, 2010). En células Jurkat después de ser incubadas con el inductor de caspasas, estaurosporina, y marcadas con FLICA o NucView presentan porcentajes iguales (93%) de las células que expresaron las caspasa 3 o 7 activa (Cen *et al.*, 2008), también se ha reportado variación hasta un 20% en los porcentajes de caspasas activas en este mismo modelo (Amstad *et al.*, 2001).

El origen de las caspasas activas en los espermatozoides es incierto. La hipótesis de la apoptosis abortiva sugiere que los espermatozoides que presentan ADN fragmentado son producto de errores ocurridos durante la diferenciación, además de que tales espermatozoides, de alguna manera eludieron ser fagocitados por las células de Sertoli (Sakkas *et al.*, 1999; 2002). Se ha demostrado que los espermatozoides recuperados del *caput*, *corpus*, y *cauda* del epidídimo de borrego ya expresan caspasas activas y no difieren significativamente, sugiriendo que en el recorrido del espermatozoide por el epidídimo no activa las caspasas, por tanto, la activación de las caspasas probablemente ocurre durante la diferenciación a espermatozoide (Gacía *et al.*, 2012). En el estudio de Blanco-Rodríguez y Martínez (1998), mencionan que las caspasas activas se restringidas al citoplasma en las espermátidas de rata, observándose eventos de la apoptosis, mientras que en los espermatozoides de borrego las caspasa activas están relacionadas con las gotas citoplasmáticas, particularmente en la pieza media (García *et al.*, 2012).

En el marcaje dual, FLICA fue incubado primero debido al tiempo en que tardan las células en ser positivas, mientras que NucView se adicionó 15 minutos después de FLICA, ambos terminaron simultáneamente y fueron procesados para la detección de las caspasas 3 y 7 activas. Nuestros resultados muestran el que el porcentaje de los

espermatozoides marcados con FLICA más NucView difiere significativamente de los espermatozoides marcados sólo con FLICA o NucView. Hay dos posibles causas para explicar la discrepancia en el marcaje dual, 1) el reactivo de NucView es identificado por caspasas activas y el reactivo de FLICA se une a otros substratos, 2) el reactivo de FLICA es identificado por caspasas activas y el reactivo NucView es dividido por otras proteínas y después al núcleo. No existe evidencia sobre un marcaje dual en las caspasas por dos substratos fluorogénicos y que existan diferencias.

La presencia de caspasas activas en los espermatozoides de algunos mamíferos es innegable y ha sido corroborado por métodos como: inmunotinción para caspasa 3 activa, inmunoblot con un anticuerpo específico de la caspasa 3, y ensayos de la actividad enzimática de la caspasa 3 (Weng *et al.*, 2002; Kotwica, 2008; Martí *et al.*, 2008). En los espermatozoides de humanos, las caspasas 3 y 7 activas se han identificado en la pieza media en espermatozoides (Kotwica, 2008), mientras que en los espermatozoides de borregos, la caspasa 3 se han identificado en la región apical, en la región ecuatorial, en la cola, en la región postacrosomal mediante inmunotinción (Martí *et al.*, 2008), pero, en el estudio de Pichardo *et al.*, (2010) se demostró que las caspasas 3 y 7 activas se localizan en la pieza media y pieza principal, y en la fosa de implantación mediante reacción enzimática. El método de la inmunotinción para caspasa 3 y caspasa 7 requiere de un anticuerpo anticaspasa 3 y anticaspasa 7 respectivamente, y un anticuerpo secundario, por ejemplo, fluoresceína Ig. Pero en el estudio de Martí *et al.*, (2008), no se especifica si el epítipo pertenece a la caspasa 3 o a la caspasa 3 activa. Mientras que el marcaje con FLICA detecta la caspasa 3 activa in situ, ante esta discrepancia los autores sugieren un par de respuestas: 1) que las caspasas se traslocan al citoplasma, como sucede en células germinales 2) que el reactivo de FLICA se asocia con otros componentes del citoplasma.

En la pieza media de los espermatozoides de rata se encuentran hasta 350 mitocondrias (Vijayaraghavan, 2006), apiladas y altamente compactadas las cuales se encargan de producir la energía necesaria para la función móvil del espermatozoide (Turner, 2006). Las mitocondrias en la pieza media son el principal sitio susceptible de eventos de la apoptosis (Garrido *et al.*, 2006). Sin embargo, las caspasas activas no se localizaron en el interior de las mitocondrias (Van Loo *et al.*, 2002). La liberación de citocromo c de la membrana interna de la mitocondria, es el evento que inicia la activación de caspasas, por la vía intrínseca en células somáticas y en células germinales testiculares (Kierszenbaum, 2002; Nuñez *et al.*, 1998) y Marchetti y Marchetti (2004) sugirieron que en los espermatozoides, la producción de ERO, la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y liberación de citocromo c de la membrana interna, parece ser la vía de activación de las caspasas. En los espermatozoides de seres humanos, el proceso de criopreservación, genera producción de ERO y permeabilidad de la membrana mitocondrial, se observa incremento en el porcentaje de los espermatozoides que expresan las caspasas 9 y 3 (Sakkas *et al.*, 2002).

Nuestros resultados muestran que algunos de los espermatozoides que se incubaron primeramente con FLICA y que fueron positivos a esta sustancia, fueron también positivos al reactivo de NucView; y algunos espermatozoides que fueron negativos a FLICA fueron positivos al reactivo de NucView, esto nos demuestra que existen diferencias en el marcaje las caspasas 3 y 7 activas (Figura 17), esto nos permite sugerir 1) que probablemente FLICA se unió a otra(s) proteína(s) y NucView fue reconocido por la caspasa 3 y 7 activa, 2) que durante la activación *de novo* de las caspasas 3 y 7 solo fueron reconocidas por NucView. Existe evidencia que reactivos de que tienen como base el principio de FLICA (b-DEVD-FMK) se une e inhibe a otras proteínas diferentes a las caspasas como lo son las metacaspasas, probablemente precursoras de las caspasas en mamíferos; el substrato también se unió a la proteína parecida a la B-catepsina mientras que el inhibidor zVAD-fmk no inhibe las metacaspasas del parásito *Leishmania mexicana* en condiciones de estrés

Al-Fadili *et al.*, (2010). Estas observaciones son consistentes con los trabajos reportados por Tempking *et al.*, (2006), quienes observaron que el inhibidor no fluorescente zVAD se unió con la proteína ANT (translocasa del nucleótido de adenina) en células mielocíticas. El inhibidor zVAD es reconocido por varias caspasas entre las cuales incluye la caspasa 3 y 7 activas. Cuando el zDEVD-fmk es empleado para disminuir la actividad de las caspasas se observa una reducción en la intensidad de fluorescencia de FLICA y de NucView, esto quiere decir que el inhibidor no fluorescente bloquea el sitio activo de las caspasas y por tanto FLICA no se unió, esto nos permite sugerir que los espermatozoides que no expresaban caspasas activas fueron activadas. Se ha reportado que el marcaje de la caspasa 3 activa mediante FLICA (FAM-DEVD-fmk) ocurre en sitios diferentes del sitio activo de la caspasa, al observar que el inhibidor zDEVD-fmk no bloqueaba la fluorescencia de FLICA en células JURL-MK1 (Kuzelova *et al.*, 2006), y que la adición del inhibidor zDEVD-fmk o zVAD-fmk no bloqueaban la fluorescencia de FLICA (FAM-DEVD-fmk) después de que la apoptosis había iniciado Pozaroski *et al.*, (2003). No se descarta la posibilidad de una segunda activación de caspasas y que fueron reconocidas por NucView, producto de la incubación a temperatura ambiente, aunque sólo se ha reportado un incremento de los espermatozoides que expresan caspasas activas a partir de dos horas (García *et al.*, 2012).

La función de la caspasa 3 activa en los espermatozoides aún es desconocida, algunos autores sugieren que la caspasa activa 3 puede estar relacionada con la fertilización en modelos *in vitro* (Marchetti y Marchetti, 2007), otros autores observaron que los porcentajes de espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas se correlacionan negativamente con la tasa de penetración y con la tasa de fertilización (Grunewald 2009; Marchetti 2004). La regulación de apoptosis en células germinales podría contribuir al gasto de energía que requieren las células germinales testiculares para su diferenciación (Kierzembaum, 2001). Existe un profundo interés en determinar el papel de las caspasas 3 y 7 ejecutoras activa en los espermatozoides, y en las células somáticas se ha observado que la caspasa 3

activa participa en procesos no letales, como la diferenciación y elongación terminal de la espermatidas (Arama *et al.*, 2001), en la memoria, conducta por ejemplo, en la formación de sinapsis (D'Amelio *et al.*, 2010). Se ha sugerido que la presencia de las caspasas activas en los espermatozoides se considere como daño del espermatozoide (Marchetti y Marchetti, 2007). Sin embargo, en el Manual de laboratorio de la OMS para el examen y tratamiento de semen humano, en su quinta edición, no se ha considerado como daño en los espermatozoides, pero se recomienda analizar espermatozoide por espermatozoide para tener un análisis más robusto sobre la fertilidad masculina (Franken y Oehninger, 2012; WHO, 2010). Probablemente si los espermatozoides que expresan caspasas 3 y 7 activas son seleccionados cuidadosamente y correctamente y se realizan pruebas de fertilización adecuadas, es posible que tengan un rol importante en el diagnóstico clínico de la fertilidad del macho.

12. Conclusión

No existen diferencias en los porcentajes de los espermatozoides que expresan caspasas activas cuando se utiliza FLICA o NucView; sin embargo, si existen diferencias entre los porcentajes de los espermatozoides que expresan las caspasas 3 y 7 activas cuando los espermatozoides se incuban con FLICA más NucView.

13. Bibliografía

- Aitken, R.J., y A.J. Koppers. 2011. Apoptosis and DNA damage in humans spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*. 13:36-42.
- Almeida, C., M.F. Cardoso, M. Sousa, P. Viana, A. Goncalves, J. Silva y A. Barros. 2005. Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Human Reproduction*. 20:1307-1313.
- Amstad, P.A., G. Yu, G.L. Johnson, B.W. Lee, S. Dhawan y D.J. Phelps. 2001. Detection of Caspase Activation In Situ by Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors. *BioTechniques*. 31:608-616.
- Aragón, A., R. Reyes y N. Pescador. 2007. Chemical messenger as male germ cell apoptosis inducers. In: *Frontiers in Cell Apoptosis Research* (Edited by S.R. Erlich). Nova Science Publisher, Inc.
- Aragón, M.A., M.E. Ayala, T.I. Fortoul, P. Bizarro y M. Altamirano-Lozano. 2005. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproduction Toxicology*. 20:127-124.
- Arama, E., J. Agapite y H. Steller. 2003. Caspase activity and specific cytochrome c are required for the sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 4:687-897.
- Blanco-Rodríguez, J. y C. Martínez-García. 1999. Apoptosis is Physiologically Restricted to a Specialized Cytoplasmic Compartment in Rat Spermatids. *Biology of Reproduction*. 61:1541-1547.
- Boatright, K.M. y G.S. Salvesen. 2003. Mechanism of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:725-731.
- Brugnon, F., L. Ouchchane, G. Verheyen, Y. Communal, J.V.d. Elst, H. Tournaye, L. Janny y G. Grizard. 2007. Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring

activated caspases in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 30:1-9.

Brum, A.M., K. Sabeur y B.A. Ball. 2008. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after criopreservation. *Theriogenology*. 69:1041:1055.

Carreau, S., S. Bourguiba, S. Lambard, I. Galeraud-Denis, C. Genissel, y J. Levallet. 2002. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 193:137-143.

Cayli, S., D. Sakkas, L. Vigue, R. Demir y G. Huszar. 2004. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Molecular Human Reproduction*. 10:365-372.

Cheng, C.Y. y D.D. Mruk. 2011. Regulation of spermiogenesis and blood-testis barrier dynamics: novel insights from studies on Eps8 and Arp3. *Journal of Biochemistry*. 435:553-562.

Cheng, C.Y. y D.D. Mruk. 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 64:16-64.

Clermont, Y., C.P. Leblond y B. Messier. 1959. Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Archives of Anatomy Microscopic and Morphological Experiments*. 48 (1): 37-55.

Crawford, E.D., y J.A. Wells. 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *The Annual Review of Biochemistry*. 80:1055-1087.

D'Amelio, M., V. Cavallucci y F. Cecconi. 2010. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death and Differentiation*. 17:1104-1114.

- Eddy, E.M. 2006. The Spermatozoon. En: Knobil and Neil's Physiology of Reproduction (Edited by J.D. Neill). 3rd edition. Elsevier. New York, USA. pp. 3-54.
- Edinger, A.L. y C.R. Thompson. 2004. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current in Cell Biology*. 16:663-669.
- Fawcett, D.W. 1975. The mamalian spermatozoa. *Development Biology*. 44:394-346.
- Florman, H.M. y T. Ducibella. 2006. Fertilization in Mammals. In: Knobil and Neil's Physiology of Reproduction. 3rd edition. Elsevier. pp. 55-112.
- Franken, D.R., y S. Oehninger. 2012. Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*. 14:6-13.
- Galluzi, L., O. Kepp, C. Trojel-Hansen, y G. Kroemer. 2012. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *European Molecular Biology Organization*. 13:322-328.
- García, S.V., A.M. Aragón y J.C. Flores-Alonso. 2012. Confocal microscopy and image analysis indicates a region-specific relation between active caspases and cytoplasm in ejaculated and epididymal sperm. *Plos ONE*. 7:1-6.
- Garrido, C., L. Galluzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot y G. Kroemer. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 13:1423-1433.
- Gibson, M. y A.O. Ahmad. 2013. Male infertility. In: *Clinical Reproductive Medicine and Surgery. A Practical Guide* (Edited by T. Falcone y W.W. Hurd). Springer NeyYork. pp.163-175.
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 68:239-247.

Graham, J.K., E. Kunze y R.H. Hammerstedt. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*. 43:55-64.

Grunewald, S., U. Paasch, K. Wuendich y H.J. Glander. 2005. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Archives of Andrology*. 51:449-460.

Grunewald, S., R. Sharma, U. Paasch, H.J. Glander y A. Agarwal. 2009. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*. 00:1-11.

Grunewald, S., T.M. Said, U. Paasch, H.J. Glander y A. Agarwal. 2007. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *International Journal of Andrology*. 31:325-330.

Hermo, L., R.M. Pelletier, D.G. Cyr, y C.E. Smith. 2010. Surfing the wave, cycle, life history and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, 73: 243–278.

Hintze, J. 2007. NCSS and GESS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. www.ncss.com.

Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinagaglia, A.A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M.G.d. Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci y E. Farber. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *International Journal of Oncology*. 21:165-170.

Kaufmann, S.H. y W.C. Earnshaw. 2000. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research*. 256:42-49.

Kerr, J.B., K.L. Loveland, M.K. O'Bryan y D.M. Kretser. 2006. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. En: Knobil and Neil's Physiology of Reproduction (Edited by J.D. Neill). 3rd edition. Elsevier. New York, USA. pp. 827-847.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie y A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. British Journal of Cancer. 26:239-257.

Kiechle, F.L. y X. Zhang. 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. Clinica Chemica Acta. 326:27-45.

Kierszenbaum, A.L. 2002. Apoptosis during spermatogenesis: The thrill of being alive. Molecular Reproduction and Development. 58:1-3.

Kim, C.H., J.H. Anh, S.U. Kang, H.S. Hwang, J.H. Pyun, and H.Y. Kang. 2010. Imiquimod induces apoptosis of human melanocytes. Archives of Dermatological Research. 302:301-306.

Kotwicka, M. 2008. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? Reproductive BioMedicine Online. 16:657-663.

Kroemer, G., W.S. El-Deiry, P. Golstein, M.E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, R.A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata y G. Melino. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death and Differentiation. 12:1463-1467.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehcke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M.E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky y G. Melino. 2009. Classification of cell death. Cell Death and Differentiation. 16:3-11.

- Kroemer, G. y S.J. Martin. 2005. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine*. 11:725-730.
- Lamkanfi, M., F. Festjens, W. Declercq, T. Vanden-Berghe y P. Vandenabeele. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation*. 14:44-55.
- Lee, J.A., J. Spidlen, K. Boyce, J. Cai, N. Crosbie, M. Dalphin, J. Furlong, M. Gasparetto, M. Goldberg, E.M. Goralczyk, B. Hyun, K. Jansen, T. Kollmann, M. Kong, R. Leif, S. McWeeney, T.D. Moloshok, W. Moore, G. Nolan, J. Nolan, J. Nikolich-Zugich, D. Parrish, B. Purcell, Y. Qian, B. Selvaraj, C. Smith, O. Tchuvatkina, A. Wertheimer, P.W. P, C. Wilson, J. Wood, R. Zigon, I.S.f.A.o.C.D.S.T. Force, R.H. Scheuermann, and R.R. Brinkman. 2008. MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. *Cytometry A*. 73:926-930.
- Lemus, A.E. y G. Pérez-Palacio. 2001. Hormonas esteroides: metabolismo. En: *Bioquímica* (Editado por J.J. Hicks). McGraw-Hill Interamericana. pp. 648-689.
- Marchetti, C., M.A. Gallego, A. Deffosse, P. Formstecher y P. Marchetti. 2004. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Human Reproduction*. 19:1127-1134.
- Marchetti, C. y P. Marchetti. 2007. Impact and significance of apoptosis in human ejaculated spermatozoa. In: *Frontiers in Cell Apoptosis Research* (Edited by S.R. Erlich). Nova Science Publisher, Inc. p.p. 125-138.
- Marchetti, C., G. Obert, A. Defosse, P. Formstecher y P. Marchetti. 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*. 17:1257-1265.
- Marchetti, P. y C. Marchetti. 2009. Apoptose des spermatozoies: mythe ou réalité. *Gynécologie Obstétrique and Fertilité*. 37:562-569.

- Martí, E.R. Pérez-Pé., C. Colás, T. Muiño-Blanco, J.A. Cebrián-Pérez. 2008. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 106:113-132.
- Martínez-Pastor, F., E. Aisen, M.R. Fernández-Santos, M.C.Esteso, A. Maroto-Morales, O. García-Álvarez y J. Garde. 2009. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction*. 137:225-235.
- McLachlan, R.I. 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 14:345-362.
- Morales, E.C.L., M.A. Aragón, S.N. Pescador y G.F. Salazar. 2012. Swim-up procedure in boar semen improves motility and viability but recovered sperm could carry active caspases and chromatin damage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11:431-437.
- Nicholson, D.W. 1996. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*. 6:1028-1042.
- Nuñez, G., M.A. Benedict, Y. Hu y N. Ionhara. 1998. Caspases: the proteases of apoptotic pathway. *Oncogene*. 17:3237-3245.
- O'Donnell, L., S.J. Meachem, P.G. Stanton, and R.I. McLachlan. 2006. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. En: *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction* (Edited by J.D. Neill). 3rd edition. Elsevier. New York, USA. pp.1017-1069.
- Paasch, U., S. Grunewald, A. Agarwal, y H.J. Glander. 2004a. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 81:802-809.
- Paasch, U., S. Grunewald, S. Dathe, y H.J. Glander. 2004b. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1030:403-409.

Pichardo, A.I., A. Aragón-Martínez, M.E. Ayala-Escobar y I.A. Domínguez-Vara. 2010. Viability test, active caspase-3 and -7, and chromatine structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *Journal of Andrology*. 31:169-176.

R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Ressner, C., U. Paasch, J. Kratzsch, H.J. Glander y S. Grunewald. 2012. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reproductive BioMedicine Online*. 25:292-299.

Robb, G.W., R.P. Amann y G.J. Killian. 1978. Daily sperm production and epidydimal sperm reserves of pubertal and adults rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54:103-107.

Russell, L.D., H.P. Ren, H.I. Sinha, W. Schulze y H.A.P. Sinha. 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*. 188:21-30.

Ruwanpura, S.M., R.I. McLachlan y S.H. Meachem. 2010. Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology*. 205:117-131.

Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Minicardi, D. Bizzaro, P.G. Bianchi y U. Bianchi. 1999. Origen of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. 4:31-37.

Sakkas, D., O. Moffatt, G.C. Minicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi y D. Bizzaro. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction*. 66:1061-1067.

Sinha-Hikim, A.P., y R.S. Swerdloff. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis. *Reviews of Reproduction*. 4:38-41.

Sinha-Hikim, A.P., C. Wang, Y. Lue, L. Johnson, X.H. Wang y R. Swerdloff. 1998. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to

Sztiller-Sikorska, M., J. Jakubowska, M. Wozniak, M. Stasiak, y M. Czyz. 2009. A non-apoptotic function of caspase-3 in pharmacologically-induced differentiation of K562 cell. *British Journal of Pharmacology*. 157:1451-1462.

Taylor, S.L., S.L. Weng, P. Fox, E.H. Duran, M.S. Morshedi, S. Oehninger y S.J. Beebe. 2004. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction*. 10:825-834.

Turner, M.R. 2006. Moving to beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction*. 18:25-38.

Vandenabeele, P., L. Galluzi, T. Vanden-Berghe y G. Kroemer. 2011. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Molecular Cell Biology*. 11:701-714.

Van Loo, G., X. Saelens, F. Matthijssens, P. Schotte, R. Beyaert, W. Declercq y P. Vandenabeele. 2002. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death and Differentiation*. 9:1207-1211.

Vijayaraghavan, S. 2003. Sperm motility: patterns and regulation. En: *Introduction to Mammalian Reproduction*. (Edited by D. Tulsiani). Kluwer Academic Publisher. Massachusetts, USA. pp. 79-91.

Weng, S.L., S.L. Taylor, M. Morshedi, A. Schuffner, E.H. Duran, S. Beebe y S. Oehninger. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction*. 10:984-991.

WHO. 2010. WHO laboratory manual for the processing of human semen. 5th edition. pp. 1-285.

Young, M.R. 1961. Principles and Techniques of fluorescence Microscopy. Journal of Microscopical Science. 102:419-449.

Zalata, A., M. El-Mogy, A. Abdel-Khabir, Y. El-Bayoumy, M. El-Baz y T. Mostafa. 2011. Sperm caspase-9 in oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. Fertility and Sterility. 96:1097-1099.