



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**“El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de
capacitación en el espermatozoide de cerdo *Sus scrofa
domesticus*”**

TESIS

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

Presenta:

MVZ. Ernesto Rodríguez Tobón

Comité Tutoral:

Directora:

Dra. Edith Arenas Ríos.

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

Asesor:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

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

Asesora:

Dra. Gisela Fuentes Mascorro.

Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal.
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

Comité Tutorial

Directora:

Dra. Edith Arenas Ríos.

Profesora Titular "C"

Laboratorio. S - 232, 234

Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

Asesores:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

Profesor Titular "C"

Laboratorio. S - 229

Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

Correo: pgdm@xanum.uam.mx

Dra. Gisela Fuentes Mascorro.

Profesora – Investigadora Titular "B"

Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA).

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Autónoma "Benito Juárez de Oaxaca.

Correo: lirauabjo@gmail.com

Este proyecto se realizó en su totalidad en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Edificio S, laboratorio S-234. Departamento: Biología de la Reproducción.

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT (PNPC) 003797.”

Número de CVU 570390 con número de becario CONACyT 302854.

El jurado designado por la comisión académica del posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la división de ciencias biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la tesis titulada: **El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación en el espermatozoide de cerdo *Sus scrofa domesticus*** que presento Ernesto Rodríguez Tobón.

Miembros del Jurado

Presidente: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura



Secretaria: Dra. Gisela Fuentes Mascorro



Vocal: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



Vocal: Dr. Alejandro Avalos Rodríguez



Agradecimientos.

Son tantas personas que han ido y venido a lo largo de este tiempo que llevo de vida, los que están, y también los que no están, me han dejado algo, alguna enseñanza, algún consejo, alguna palabra, algo... ¿exactamente qué? No lo recuerdo, me gustaría recordarlo todo, seguramente sería un mejor ser humano, pero de todas esas personas, hay una que jamás se ha ido, aunque yo si lo haya hecho, siempre está a mi lado apoyándome de formas que jamás lo hubiera imaginado, siempre con una palabra, con una mirada o simplemente estando presente, mostrándome su fortaleza en cada una de sus acciones, esa persona es mi madre; **Gisela Tobón García**, mi agradecimiento es infinito para ti mamá, sin ti no sé qué sería de mí, ¡te amo! Gracias por existir, gracias por darme la vida...gracias por darme esta vida, gracias por ser mi heroína y sobre todo, gracias por ser mi ejemplo de vida.

Gracias también a ti **Nelly Rodríguez Tobón**, por ser una hermana fabulosa, llena de vida, tu talento y ejemplo de independencia es algo que siempre admire y admiro, de alguna forma siempre he querido tener tu valor de hacer las cosas. Gracias por apoyarme y siempre mostrar interés en mi proyecto de vida.

De igual manera, agradezco a mi abuela **Nelly García García** y a mi abuelo **Carlos Tobón Tamayo** por ayudarnos cuando más lo necesitábamos.

Mis amigos de toda la vida son parte fundamental, y no solo de este proyecto de vida, han estado acompañándome por más de 20 años de amistad, **Carlos, Rodrigo, Agustín y Cecilia**, están y espero que sigan estando por mucho tiempo, también a ustedes tengo que agradecer, solo que no tengo palabras, han estado en tantas etapas de mi vida que no sabría por dónde comenzar, simplemente gracias por estar presentes, por su apoyo, por su compañía, por su cariño, por sus palabras, por su confianza, por su paciencia, por su canción y sobre todo, gracias por dejarme ser parte activa de su vida, este trabajo también es de ustedes.

Este proyecto tiene un cómplice, así me gusta llamarlo, sin él, el laboratorio no sería lo que es, sin él, muchos proyectos no serían una realidad, y sin él, yo no hubiera llegado a este lugar, **Ahiezer Rodríguez Tobón**, gracias primo, te considero un amigo y un excelente investigador, Joshua tiene un maravilloso padre en tu persona, me da gusto trabajar a tu lado, gracias por tus consejos, gracias por tu apoyo y sobre todo gracias por tu confianza, este proyecto también es tuyo.

Pocas personas lo saben, pero Ahiezer fue quien me presento a la principal protagonista de este proyecto, me refiero a la **Dra. Edith Arenas Ríos**, quien me acepto en su grupo de trabajo sin conocerme, solo sabía mi nombre, y que tenía la intención de ingresar a una maestría, y no solo me acepto, me apoyo plenamente desde el primer día y me sigue apoyando a la fecha de forma incondicional.

Desde que tengo el privilegio de trabajar con la Dra Edith mi mente se ha expandido no solo en el terreno académico, también en el personal, ya que la considero una amiga con la cual platicar, y saber que puedo confiar en ella. Dra Edith, es usted una mujer excepcional, la admiro, primero, como ser humano, después, como investigadora y la respeto profundamente; le agradezco toda la confianza que ha depositado en mí, le agradezco toda su paciencia, sus palabras, su enorme sentido de la responsabilidad, su compromiso con este proyecto y con los otros en los que he tenido el gusto de participar, su sinceridad, sus enseñanzas, sus preguntas, su sencillez, su exquisito gusto por el café y

compartirlo conmigo, su respeto por todo ser vivo, le agradezco permitirme trabajar a su lado y sobre todas las cosas agradezco haberla conocido. Gracias Dra, muchas gracias.

Otra persona que llegó a mi vida y espero no se vaya nunca, es **Blanca**, desde que Blanca llegó al laboratorio probó su valía, su tenacidad en el laboratorio está más que comprobada, probablemente es por ese motivo que nos hicimos tan amigos en cuestión de días, en mi experiencia, los mejores investigadores son las personas más sencillas y abiertas a compartir su conocimiento, y eso eres Blanca, una de las mejores investigadoras que conozco, gracias por ser tan abierta conmigo y dejarme entrar en tu vida, gracias por compartir tantos buenos momentos, este proyecto también es tuyo.

Con tanta presión y trabajo que nunca tiene final, es necesario, realmente necesario contar con alguien que tenga la capacidad de separar la vida escolar y la vida fuera de la universidad, **Ileri** es parte crucial de este proyecto de vida, las pláticas interminables hasta el amanecer con el sabor de una buena cerveza, eran un verdadero oasis en el desierto, conocer un poco de su talento con la cámara fotográfica y su creatividad para crear con las manos figuras tan perfectas como la que me acompañó cuando estaba lejos, son un conjunto de pequeños detalles que me llenan de energía y de vida, y, por si fuera poco, el amor que tiene por los animales y por la naturaleza es tan genuino y sincero que no puedo evitar querer estar cerca de ella, gracias Ileri por todo lo que aportas a mi vida, gracias por confiar en mí y tomar en cuenta mi opinión, gracias por tu opinión sincera a este trabajo y tus preguntas tan críticas que me hacen reflexionar y pensar muy bien la respuesta, tu inteligencia académica y emocional es algo que no me canso de admirar.

Fabiola y Lorena, también a ustedes les agradezco los buenos momentos y su tiempo para estar en los seminarios. Gracias por su apoyo y siempre recibirme con una sonrisa cuando necesite algo de ustedes. Lorena, tu carácter es algo admirable, te agradezco que cuando la presión estaba al máximo, tu siempre mantuviste la sonrisa y la buena vibra, eso me retroalimenta cada día. ¡Gracias!. Y Fabi, gracias por ser tan relax, y demostrarme que la vida continúa por más complicada que parezca, admiro tu entereza y fortaleza ante la adversidad y la injusticia. Este proyecto también es de ustedes.

Muchas gracias a mis compañeros de maestría, pero en especial a **Roberto a Itzel a Antonio** y a **Ivonne**, gracias por los buenos momentos y por su valiosa ayuda en este proyecto.

Muchas gracias también al **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**, le agradezco su confianza y sus palabras, las cuales me impulsaron a realizar proyectos fuera de México, gracias a usted se hicieron realidad, pero no solo eso, me considero muy dichoso de ser alumno suyo. Gracias.

También, muchas gracias a la **Dra. Gisela Fuentes Mascorro**, por su apoyo y valiosa aportación a este proyecto. Agradezco mucho todo el tiempo que me brinda, y sobre todo, quiero darle las gracias por todos los kilómetros que recorre cada ocasión que la necesitamos, también, quiero agradecerle por uno de los momentos más increíbles que he vivido, contemplar la belleza y nobleza de la naturaleza en la playa de Escobilla no hubiera sido posible sin usted. Gracias.

De igual forma agradezco a la **Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**, por su valiosa participación en la revisión de este trabajo.

También, quiero aprovechar la oportunidad para agradecer al **Dr. Alejandro Avalos Rodríguez**, por su valiosa participación en la revisión de este trabajo.

Una parte muy importante en mi vida para estar sano mentalmente, bueno, en la manera de lo posible, es la labor que hago en el centro de control canino de Ecatepec, dirigido magistralmente por el **MVZ. José Luis Trejo**, a quien considero un amigo y excelente médico veterinario, sin mencionar que es un increíble melómano, aparte, es de las pocas personas que verdaderamente admira la belleza y riqueza de nuestra cultura. Gracias por dejarme pertenecer a la gran familia que usted comanda y por dejar desarrollarme como médico veterinario.

Dentro de mí vida como veterinario, existe una “personita” maravillosa, fundamental y pilar central, no solo en mi vida académica y personal, gracias a ella, el centro de control canino en Ecatepec, es un lugar donde puedes desarrollarte como profesional de la salud con un altísimo nivel de calidad y ética profesional, sin mencionar su profundo cariño y respeto por todos los animales. La **MVZ. Karla Ramírez**, no solo es mi amiga, no solo es la persona con la que compartí un par de viajes increíbles por el interior de México, es mi maestra de cirugía en tejidos blandos, y la mejor cirujana que he visto trabajar. Gracias Karlita por ser todo lo que eres, gracias por toda esa ternura que siempre me diste, cada oportunidad que tengo de trabajar a tu lado me llena de energía y de vida para continuar, me has apoyado desde el servicio social de forma incondicional, es un honor en cada cirugía contar con tu apoyo, me das mucha seguridad y confianza. Gracias por todo Karlita.

Una persona que a la fecha sigue siendo un ejemplo de profesionalismo, amor por los animales y a la medicina veterinaria, es la **MVZ. Esp. Mussme Delgado de la Cadena**, quien, en mis inicios como veterinario, me apoyo, me oriento y me guio en mi formación, convirtiéndose en una persona fundamental en mi vida, gracias por todas su enseñanzas y brindarme su amistad en mi aventura por el norte de México.

Y claro, mis buenos amigos **Miguel Ángel Elías** y **Carlos Celis**, quienes, durante toda la carrera en la UAM-Xochimilco, pocas veces nos separamos y siempre trabajamos en equipo, ya sea fuera o dentro de la universidad, ambos, me abrieron las puertas de sus hogares, teniendo el verdadero honor de conocer a su apreciable familia. Gracias Elías, gracias Carlos, por brindarme su amistad, siempre los llevo en mis recuerdos.

No puedo olvidar el gran apoyo que me brindo el **Dr. Joaquín Gadea**, así como la **Dra. Raquel Romar**, el **Dr. Salvador Ruiz** y la **Dra. Carmen Matás**, quienes me dieron toda su confianza durante mi estancia en la Universidad de Murcia, y las excelentes personas que conocí y me hicieron la estancia más agradable, gracias a **Rebeca, Fernando, Soledad, David, Jonh, Lucia, Mercedes** y en especial a **Silvia**.

Gracias a la familia **Tobón**.

Gracias a la familia **Rodríguez**.

Índice

I.	Glosario.....	10
II.	Resumen.....	13
III.	Abstract.....	15
IV.	Introducción.....	17
V.	Síntesis y Maduración de Espermatozoides.....	19
VI.	Capacitación Espermática.....	24
	a. Definición.....	24
	b. Cambios Durante la Capacitación.....	29
	c. Hiperactivación Espermática.....	30
VII.	Reacción Acrosomal.....	33
	a. Definición.....	33
	b. Cambios Durante la Reacción Acrosomal.....	35
VIII.	Participación de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en la Capacitación.....	38
	a. Radicales Libres y ERO.....	40
	b. Participación de las ERO en la Capacitación.....	42
IX.	Sistemas Antioxidantes: Enzimático y No Enzimático.....	44
	a. Enzimas Antioxidantes.....	44
	b. Sistema No Enzimático: Glutación.....	45
	c. Metabolismo del Glutación.....	48
X.	Antecedentes.....	50
XI.	Justificación.....	52
XII.	Pregunta de Investigación.....	53
XIII.	Hipótesis.....	53
XIV.	Objetivo General.....	53

XV.	Objetivos Particulares.....	54
XVI.	Diseño Experimental.....	55
XVII.	Material y Métodos.....	55
	a. Espermato-bioscopia.....	56
	b. Determinación de la Capacitación Espermática.....	58
	c. Fosforilación de Residuos de Tirosina.....	59
	d. Cuantificación de Grupos SH.....	60
	e. Análisis de Resultados.....	60
XVIII.	Resultados y Discusión.....	60
XIX.	Conclusiones.....	70
XX.	Referencias Bibliográficas.....	71

I. Glosario.

AC - Adenilato Ciclasa.

ACs - Adenilato Ciclasa Soluble.

ADN - Ácido desoxirribonucleico.

AMP – Monofosfato de Adenosina.

AMPc – Monofosfato Cíclico de Adenosina.

ARF - Factor de ADP-ribosilación.

ATP - Adenosina Trifosfato.

Ca⁺² - Ion Calcio.

CAT - Catalasa.

Cl⁻ - Ion Cloro.

CO₂ - Dióxido de Carbono.

CSP - Complejo de Señales Proteínicas.

CTC - Clorotetraciclina.

Cys - Cisteína.

DAG - Diacilglicerol.

ERO - Especies Reactivas del Oxígeno.

FIV - Fertilización *In Vitro*.

GCL - Glutamato Cisteína Ligasa.

GCLC - Glutamato Cisteína Ligasa, Subunidad Catalítica.

GCLM - Glutamato Cisteína Ligasa, Subunidad Reguladora.

Glu - Ácido Glutámico.

Gly - Glicina.

GMPc – Monofosfato Cíclico de Guanosina.

GPCR - Receptor Acoplado a Proteínas G.

GPX - Glutación Peroxidasa.

GR - Glutación Reductasa.
GSH - Glutación Reducido.
GSSG - Glutación Oxidado.
GST - Glutación S-transferasa.
H⁺ - Protón (Cación de Hidrógeno).
H₂O₂ - Peróxido de hidrógeno.
HCO₃⁻ – Ion Bicarbonato.
HOCl - Ácido hipocloroso.
Hv - Canal Específico de Protones.
IP₃ – Trifosfato de Inositol.
K - Potasio.
LPA - Ácido Lisofosfatídico.
LPA-receptor - Receptor de Ácido Lisofosfatídico.
MAE - Membrana Acrosomal Externa.
MAI - Membrana Acrosomal Interna.
MAPK – Proteína Cinasa Activada por Mitógenos.
Na - Sodio.
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NBC – Cotransportador Na / Bicarbonato.
NO• - Óxido Nítrico.
O²⁻ - Anión superóxido.
O₂ - Oxígeno.
OH• - Radical Hidroxilo.
ONOO- - Peroxinitrito.
PA - Ácido Fosfatídico.
PC - Fosfatidilcolina.

PIP₂ - Fosfatidilinositol Bifosfato.
PKA - Proteína Cinasa A.
PKC - Proteína Cinasa C.
PLC - Fosfolipasa C.
PLD - Fosfolipasa D.
PUFA - Ácidos grasos poliinsaturados.
RA - Reacción Acrosomal.
RO• - Radical Alcoxilo.
ROO• - Radical Peroxilo.
ROOH - Hidroperóxidos orgánicos.
sNHE- Na / Hidrógeno Intercambiador.
SOD - Superóxido Dismutasa.
TK - Tirosina Cinasa.
TP - Tirosina Fosfatasa.
TPe - Teca Perinuclear.
VPA - Vaina post Acrosomal.
ZP - Zona Pelúcida.
γ-GT - γ-Glutamil Transpeptidasa.

II. Resumen.

Después de que los espermatozoides abandonan el testículo no son capaces de fertilizar al ovocito, por lo que deberán pasar por un par de estructuras para adquirir esa capacidad: 1) el epidídimo y 2) el tracto reproductor femenino. El primero le permitirá adquirir el potencial para llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal, en el segundo es donde se desarrollarán estos dos procesos y concluirá con la fertilización. Los espermatozoides dependen del O_2 , entre otras cosas, para la obtención de energía; sin embargo, el consumo de O_2 genera metabolitos y moléculas peroxidativas (prooxidativas), conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales tienen efectos nocivos en los espermatozoides, provocando daños a la membrana plasmática y al ADN, afectando así la movilidad y viabilidad celular. Sin embargo, existe información que indica que la generación de las ERO está implicada en las distintas vías de señalización, favoreciendo procesos como la capacitación espermática. Los sistemas enzimáticos antioxidantes [superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX)] son los encargados de proteger al espermatozoide contra la generación de estrés oxidante. Particularmente la GPX se encarga de metabolizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido de manera endógena, usando como sustrato al glutatión reducido (GSH) y que, por acción de esta enzima, es oxidado (GSSG) y puede volver a su estado reducido por acción de la enzima glutatión reductasa (GR) para que el GSH vuelva a tener actividad antioxidante; proceso conocido como ciclo redox. El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de la concentración de GSH en la regulación de los procesos de fosforilación de

tirosinas y formación de grupos sulfhidrilo (SH), en espermatozoides porcinos, durante el proceso de capacitación. Se adicionaron diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1.0 y 5.0 mM) en medio capacitante y se determinó el proceso de capacitación *in vitro* en espermatozoide de cerdo, usando como indicadores la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas y la formación de grupos sulfhidrilo. Se demuestra que hay un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados cuando se adicionó la concentración de GSH 1mM, asociado con una mayor fosforilación de residuos de tirosinas; así como una menor capacitación espermática cuando se adicionó una concentración de GSH 5mM, asociado con una mayor cantidad de grupos SH. Por lo tanto, se puede sugerir que el GSH participa en la fosforilación de residuos de tirosina y en la formación de SH en el proceso de capacitación y que la concentración óptima de GSH es de 1mM, ya que las concentraciones más altas o bajas no tienen el mismo efecto en el proceso de capacitación en espermatozoides de cerdo. Estos resultados permitirán apoyar la reproducción asistida, usando concentraciones optimas de GSH en semen fresco o congelado, y con futuros estudios, se podría proponer para otras especies, incluido el humano.

III. Abstract.

After spermiation, the sperm cells are unable to fertilize the egg, therefore it must go through a couple of maturational processes to acquire that capacity: 1) in the epididymis and 2) in the female reproductive tract. In the First one, they will acquire the potential to capacitation and acrosome reaction in the second one, concluding with fertilization. The sperm cells are O_2 dependent, inter alia, for obtaining energy, however, O_2 consumption and its metabolites generate prooxidative molecules, all known as reactive oxygen species, which are known for their harmful effects in sperm cells, causing damage to the plasma membrane, DNA; thus affecting the motility and cell viability. But now there are information indicating that ROS generation is involved in several signaling pathways, favoring processes such as sperm capacitation. The system of antioxidants enzymes: superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase; protect the sperm cells against oxidative stress. Particularly GPX metabolized the hydrogen peroxide (H_2O_2) endogenous, using as substrate the reduced glutathione (GSH) and by action of this enzyme is oxidized (GSSG), it returns to its reduced by action of the enzyme glutathione reductase (GR), so GSH will have again, antioxidant activity, a process known as redox cycle. The aim of this study was to determine whether the concentration of GSH is important in regulating the processes of tyrosine phosphorylation and formation of sulfhydryl groups in the boar sperm capacitation. Different concentrations of GSH were added in capacitation medium (C, 0.5, 1 and 5 mM) and the capacitation *in vitro*, tyrosine phosphorylation and formation of sulfhydryl

groups (SH) in boar sperm cells were determined. A higher percentage of capacitated sperm, is observed when we added 1 mM GSH, associated with increased of tyrosine phosphorylation; and a lower sperm capacitation is observed when we added 5 mM GSH, associated with a greater amount of SH. Therefore, it can be concluded that GSH can regulate phosphorylation of tyrosine residues and the formation of SH in the sperm capacitation, requiring optimal concentrations of GSH for sperm capacitation in boar.

IV. Introducción.

Una característica distintiva de la reproducción sexual es la interacción entre los gametos masculino y femenino para la generación de un nuevo individuo, lo cual involucra una serie de procesos que resultan tan complejos como variados, dichos procesos se encuentran organizados y orquestados por el sistema neuroendocrino y, en el caso muy particular del espermatozoide, su proceso para ser una célula plenamente apta para la fertilización, termina en el tracto reproductor femenino [1].

La producción de gametos masculinos ocurre en el testículo y se da a través de un proceso conocido como *espermatogénesis*. Los espermatozoides, hasta este momento, no son capaces de fertilizar al ovocito, por lo que deberán ingresar al epidídimo para completar su maduración. Este proceso le permitirá a la célula completar los cambios estructurales y funcionales que les proporcionarán el potencial para llevar a cabo los procesos de capacitación y reacción acrosomal (RA) en el tracto reproductor femenino, lo que les permitirán concluir en la fertilización [1, 2].

Después de que los espermatozoides han recorrido la cabeza y el cuerpo del epidídimo, son almacenados en la porción de la cola antes de ser eyaculados; en el cerdo se ha reportado que el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es de aproximadamente 9 días [3, 4]. El proceso de eyaculación es activado por el sistema nervioso central, promoviendo que las fibras musculares que rodean al epidídimo favorezcan la expulsión de los espermatozoides hacia la uretra y la interacción que tienen con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias formarán el

semen [3]. Sin embargo, el espermatozoide aún tiene que pasar por un par de procesos más, antes de llevar a cabo la fertilización: La *capacitación espermática* y *RA*. En humanos este proceso parece estar regulado, en parte, por reacciones de óxido-reducción [5, 6] donde participan las especies reactivas del oxígeno (ERO). Los espermatozoides, al igual que otras células en condiciones aeróbicas, son capaces de producir ERO, las cuales se consideran nocivas para los espermatozoides, provocando daños en la membrana y ADN; afectando la movilidad y viabilidad espermática [7, 8].

Sin embargo, existe evidencia que indica, que la generación de las ERO está implicada en la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, procesos entre los que se encuentran: la capacitación y la RA [5, 6]. Se postula que la generación de cantidades controladas de ERO, tales como el anión superóxido (O_2^-) y su producto de dismutación, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), están involucradas en la regulación y funciones fisiológicas de los espermatozoides (Figura 1) [5, 6].

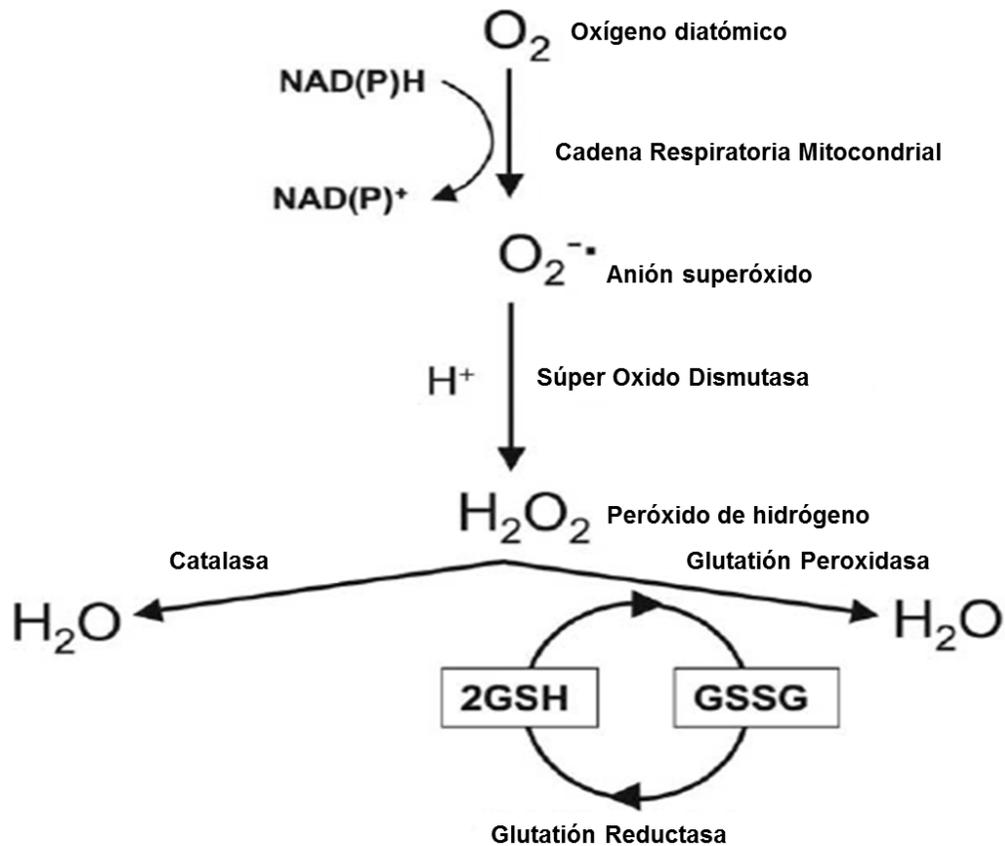


Figura 1. Ciclo redox. La cadena respiratoria mitocondrial se ha descrito como el sitio principal donde se producen las ERO, la enzima superóxido dismutasa convierte al $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , el cual tiene que ser eliminado del sistema, esto lo puede realizar la enzima catalasa o glutatión peroxidasa, esta última utiliza glutatión reducido (GSH) como el donador de electrones [9].

V. Síntesis y Maduración de Espermatozoides.

La *espermatogénesis*, es un proceso dinámico tanto en el espacio como en el tiempo. En términos generales se reconocen tres fases que la caracterizan: mitosis o proliferación, meiosis o reducción, y diferenciación o espermiogénesis (Figura 2) [10].

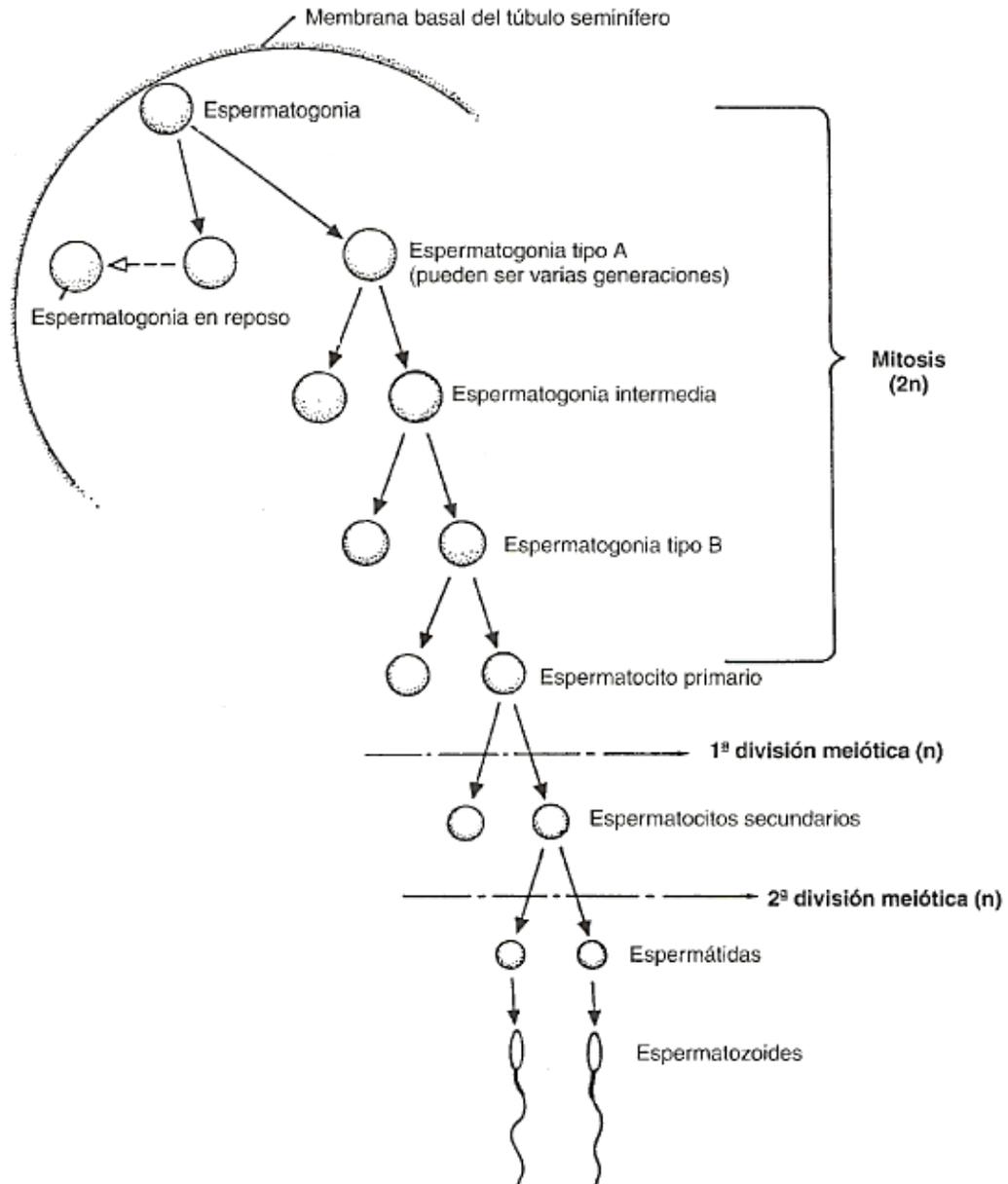


Figura 2: Diferentes divisiones celulares durante la espermatogénesis: La proliferación celular comienza por la división mitótica de una espermatogonia, en espermatogonia tipo A y tipo B, para continuar su división en espermatocito primario, posteriormente y por una primera división meiótica convertirse en espermatocito secundario y en una segunda división espermátida, para finalmente diferenciarse en espermatozoide [2].

En la fase de proliferación, las espermatogonias experimentan varias divisiones mitóticas para formar espermatocitos, los cuales, por división meiótica, forman espermátidas haploides y durante dicha división se realiza el intercambio genético y la transformación en células haploides al final de la meiosis [10, 11].

Por último, las espermátidas se diferencian en espermatozoides como resultado de una complicada metamorfosis, mejor conocida como espermiogénesis, la cual involucra modificaciones estructurales en la forma del núcleo, la compactación de la cromatina nuclear, la formación del acrosoma, el establecimiento de un flagelo que le permitirá posteriormente la movilidad y la fagocitosis del citoplasma por la célula de Sertoli. En consecuencia, la espermatogénesis constituye la renovación y proliferación de espermatogonias indiferenciadas, su diferenciación, la meiosis de los espermatocitos y la metamorfosis de las espermátidas para formar espermatozoides [10, 11].

La duración total de la espermatogénesis es de aproximadamente 30 a 75 días en los mamíferos. En el caso particular del cerdo, la espermatogénesis dura alrededor de 40 días, ocupando una gran cantidad del tiempo en la diferenciación [11, 12].

Los espermatozoides recién liberados del testículo no son capaces de exhibir movilidad progresiva, de experimentar capacitación, RA, ni de fecundar al ovocito; estas habilidades son desarrolladas durante su paso por el epidídimo mediante un proceso conocido como *maduración espermática epididimaria* [13]. Una vez adquiridas esas capacidades, los

espermatozoides son almacenados, acumulándose hasta alcanzar una cantidad suficiente de espermatozoides, y asegurar que la inseminación sea exitosa [14].

La maduración espermática epididimaria consiste en cambios estructurales y funcionales que ocurren en el espermatozoide durante su paso por el epidídimo. Estos cambios incluyen:

- a) Marcado incremento en el vigor de la movilidad, el paso del movimiento no progresivo a progresivo.
- b) El desplazamiento de la gota citoplásmica del cuello a la pieza media o distal del flagelo, para posteriormente perderse.
- c) Cambios en la carga eléctrica de toda la superficie celular, resultado de modificaciones en las proteínas de la membrana plasmática.
- d) Modificación del cociente fosfolípidos / colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide.
- e) En algunas especies, la remodelación masiva de la forma del acrosoma como en el ratón.

Con estas modificaciones, el espermatozoide adquiere parte de su habilidad para fertilizar al ovocito [14, 15].

En la mayoría de los mamíferos estudiados, los espermatozoides son almacenados en la cola del epidídimo en un estado de quiescencia antes de

la eyaculación, estado que es mantenido por uno o más mecanismos diferentes, entre los que se pueden mencionar [14]:

- a) La disminución de la concentración del ion sodio en el lumen del túbulo epididimario.
- b) La alta concentración de espermatozoides (millones/mL), lo cual reduce la concentración de O₂ y aumentará la de CO₂.
- c) La secreción de mucoproteínas viscosas por parte de las células epiteliales.
- d) La producción de ácidos permeables que mantienen los valores de pH bajos en el interior de los espermatozoides [14].

El tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo, puede variar entre especies, reportando entre 15 y 22 días, aunque pueden ser almacenados mucho más tiempo [15].

Los espermatozoides cuentan con moléculas conocidas como factores descapacitantes que evitan que se capaciten; estas moléculas se originan en las secreciones testiculares, epididimarias y seminales, por ejemplo: el zinc (Zn⁺²) y el colesterol; estos funcionan protegiendo a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento en la región caudal del epidídimo, estabilizando el acrosoma; es importante su remoción, pues estos factores actúan bloqueando a los receptores o grupos electrostáticos localizados en la membrana [13] y evitan también que se unan a la zona pelúcida (ZP) del ovocito. De igual forma en los espermatozoides se han identificado receptores de hormonas esteroides en la membrana plasmática,

en el caso particular del cerdo se han identificado receptores a estrógenos y andrógenos [16, 17], en el caso del humano se han reportado también receptores a estrógenos y progesterona [18], en ambos casos la presencia de estas hormonas y la actividad de sus receptores se relaciona directamente con la capacitación [19-21].

VI. Capacitación Espermática.

a. Definición.

El proceso de *capacitación espermática* inicia en el tracto reproductor de la hembra y consiste en cambios fisiológicos y bioquímicos que se producen en el espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, para adquirir su capacidad fertilizante, además, se requiere de la comunicación entre el espermatozoide y el ambiente del tracto reproductor de la hembra para que este se pueda desplazar y llegue a la primera parte del oviducto, donde finalmente adquirirá la hiperactivación [19].

En la actualidad, se puede llevar a cabo la capacitación *in vitro*, realizando la incubación en medios de fertilización *in vitro* (FIV) o en medios ricos en calcio (Ca^{+2}) y bicarbonatos. De igual forma se pueden utilizar espermatozoides de origen epididimario o directamente del eyaculado, reportándose que, los espermatozoides de origen epididimario, de la región de la cauda, pueden alcanzar la capacitación *in vitro* y fertilizar al ovocito de una forma más eficaz que los espermatozoides del eyaculado [22, 23].

Para lograr una mejor comprensión del fenómeno de capacitación espermática, es importante mencionar que en el caso muy particular del

cerdo se ha reportado una longitud total del espermatozoide de 50-60 μm y estructuralmente el espermatozoide se divide en (Figura 3) [22, 24]:

- *Cabeza*. Tiene una longitud de 8.84 a 8.95 μm y un perímetro de 26.33 a 27.65 μm y es el lugar donde se localiza el *núcleo* que contiene al ADN altamente condensado, gracias a las proteínas denominadas protaminas. El principal elemento del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide es *la teca peri nuclear (TPe)*, una cápsula rígida que cubre el núcleo de los espermatozoides de mamíferos, y tiene como función la unión de las membranas espermáticas y la preservación de su integridad. La TPe se subdivide en dos regiones: *la capa subacrosomal* (sirve para anclarlo a las vesículas derivadas del aparato de Golgi) y *postacrosomal*, la cual se considera que participa en la activación del ovocito durante la fertilización, de igual forma, es el sitio donde se encuentra la actina en algunos mamíferos; el segmento ecuatorial, es considerado como un complejo súper doblado de la TPe; la membranas *acrosomal interna (MAI)* y *externa (MAE)*; que transportan receptores involucrados en la unión espermatozoide-ovocito; *la vaina post acrosomal (VPA)*; la cual, tiene un complejo de señales de proteínas (CSP) o factores activadores del ovocito.
- *Flagelo*. Es la parte encargada del movimiento, se divide en cuatro regiones: *la pieza de conexión*, con una longitud de 1 μm , es la que une a la cabeza con el flagelo; *la pieza media*, con una longitud de 10 μm , es donde se encuentran las mitocondrias en un arreglo helicoidal;

la *pieza principal*, la cual abarca la mayor parte del flagelo utilizada en la propulsión, cuya longitud varía entre 30 y 50 μm , y la *vaina fibrosa* o parte terminal, la cual mide 3 μm .

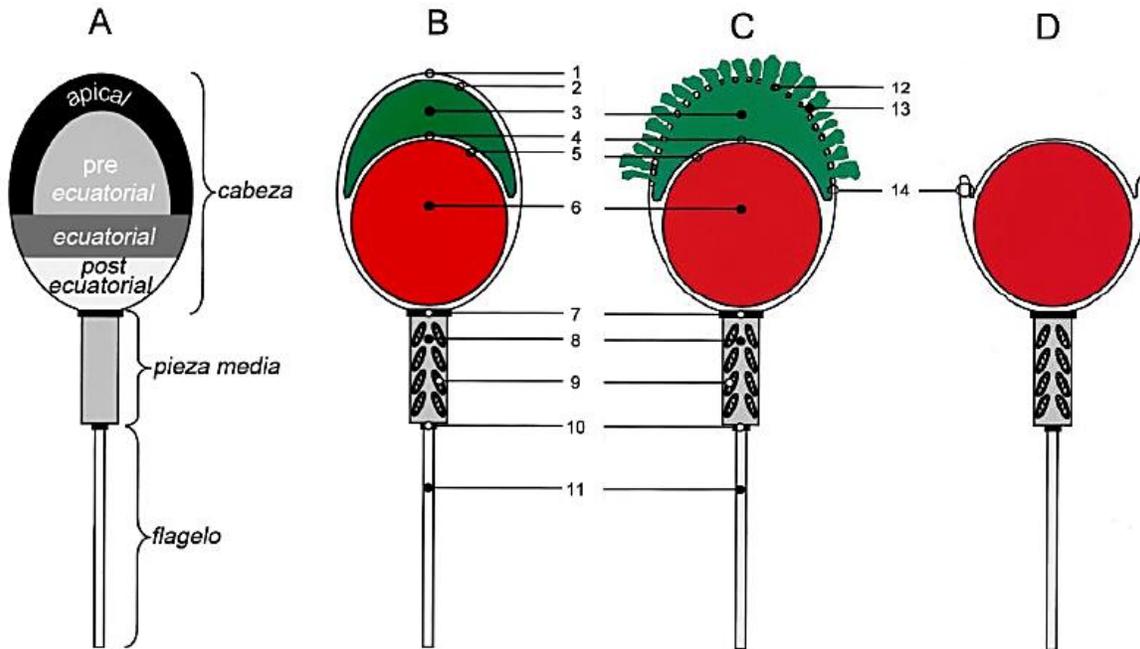


Figura 3. Partes del espermatozoide vistas a través de un corte sagital: A) Cabeza, pieza media y flagelo: la cabeza se divide en 4 regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. B) 1: Membrana plasmática, 2: Membrana acrosomal externa, 3: Contenido acrosomal, 4: Membrana acrosomal interna, 5: Núcleo celular, 6: Contenido de ADN altamente condensado, 7: Anillo posterior o placa basal, 8: Pieza media, 9: Mitocondria, 10: Anillo anular, 11: Flagelo. C) Contenido acrosomal que es liberado durante la RA, (enzimas hidrolíticas) 12: Vesícula (fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, 13: Secreción acrosomal. (D) Exposición de la membrana acrosomal interna después de la reacción acrosómica, 14: Estructura de horquilla [25].

Por otro lado, se ha reportado que la localización de la actina en la región del acrosoma de algunos mamíferos respalda su posible participación

en la capacitación espermática y en la RA; así, los procesos de polimerización y despolimerización de la actina podrían estar involucrados en la función espermática. En el espermatozoide de cerdo, la inhibición de la polimerización de la actina bloquea su capacidad para fertilizar [19].

Así mismo, el axonema es el núcleo estructural responsable de la movilidad del espermatozoide, el cual se compone de nueve dobletes (A y B) de microtúbulos periféricos y dos microtúbulos centrales, esta disposición estará presente en toda la longitud del flagelo. Los brazos de dineína, los cuales se encuentran anclados a los microtúbulos y se presenta tanto de forma interna como externa son los principales encargados del deslizamiento de los microtúbulos (Figura 4) [7].

Se ha descrito que los dos brazos de dineína tienen diferentes funciones, por un lado, los brazos externos de dineína presentan una distancia de 24 nm a lo largo de los microtúbulos y su unión con el microtúbulo A se ha descrito como insensible al ATP. Por otro lado, los brazos internos de dineína se presentan en tres sub-unidades y se distribuyen por igual en segmentos de 96 nm. La primer sub-unidad es de cadenas pesadas (α y β de aproximadamente 500 kDa) y presentan cuatro sitios de unión al ATP. La segunda sub-unidad, conocida también como de cadenas intermedias (60-120 kDa), se encuentra en la base de las moléculas de dineína y también son insensibles al ATP. Por último, se presenta la sub-unidad de cadena ligera (8-20 kDa), son proteínas que tienen funciones diversas como las de unión con el Ca^{2+} y funciona de manera similar a la tioredoxina. De esta manera los brazos externos de

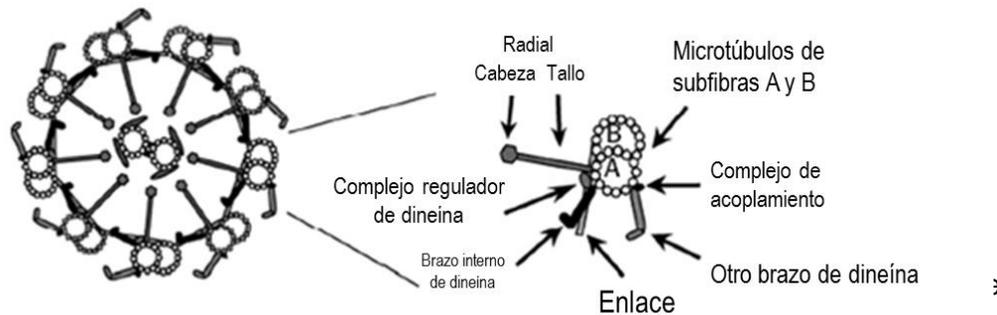
dineína determinan la velocidad máxima y los brazos internos de dineína regulan la forma y la onda flagelar (Figura 4) [7].

El complejo regulador de dineína está fuertemente unido a la red de microtúbulos y podría funcionar como andamio para enzimas que regulan y modifican la actividad de la dineína o como un sensor para la tensión dentro del axonema además de proporcionar realimentación mecánica a los brazos de dineína (Figura 3) [7].

A un costado de los brazos internos de dineína y anclado en los microtúbulos A, se encuentran los radiales, estructuras en forma de “T”, los cuales se han señalado como proteínas de unión con la proteína cinasa A (PKA) y, debido a su ubicación, los radiales proporcionan un enlace estructural entre el aparato central y los brazos de dineína. La pareja de radiales centrales regula la velocidad de deslizamiento de los microtúbulos y coordina la actividad de los brazos tanto internos como externos de dineína, dependiendo de la disponibilidad de ATP. Por lo tanto, los microtúbulos del par central y los radiales son esenciales para la movilidad; además, la interacción de estas estructuras podría actuar como un transductor de señal química y mecánica para controlar el tamaño así como la forma de la curva flagelar y para la modificación de la movilidad en respuesta a señales específicas (Figura 4) [7].

De igual manera las tubulinas α y β son los principales componentes de los microtúbulos y son de gran importancia para dar estructura y movilidad. La tubulina está a menudo sometida a modificaciones post

traduccionales, por ejemplo fosforilación, esta modificación es sumamente importante para la movilidad del axonema [7].



compone de nueve dobletes de microtúbulos periféricos y dos microtúbulos centrales, esta disposición estará presente en toda la longitud del flagelo. Los brazos de dineína se encuentran anclados a los microtúbulos y se presentan tanto de forma interna como externa, siendo los principales encargados del deslizamiento de los microtúbulos [7].

b. Cambios Durante la Capacitación.

En el proceso de capacitación, el espermatozoide pasa por una serie de transformaciones, caracterizadas por la hiperactivación producto de cambios membranales, en el metabolismo energético, así como una importante actividad enzimática; cabe aclarar que, sólo los espermatozoides capacitados pueden someterse a RA [5]; sin embargo, estos procesos no se desarrollan adecuadamente sin antes haber completado los procesos previos como la espermatogénesis (en el testículo) y la maduración espermática epididimaria [26]. De igual manera, las ERO tienen una participación en el proceso de capacitación, donde se han asociado con un aumento en la fosforilación de tirosinas, las ERO estimulan directamente a la

enzima adenilato ciclasa soluble (ACs) y la tirosina cinasa (TK) e inhibe a la tirosina fosfatasa (TP) [27].

Se conocen algunas modificaciones en las lipoproteínas de la membrana plasmática (Figura 6) [19]:

a) Activación de canales iónicos que intervienen en la activación de mecanismos de transducción de señales como flujo de Ca^{+2} , síntesis de AMPc (Monofosfato Cíclico de Adenosina), procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas).

b) Cambio del metabolismo energético que conduce a la desestabilización de la membrana plasmática en la región acrosómica y la hiperactivación del movimiento flagelar.

Además, durante la capacitación espermática también las proteínas y los lípidos de membrana son modificados, lo que permite que el espermatozoide sea capaz de unirse a la zona pelúcida y que lleve a cabo la RA [13, 19].

c. Hiperactivación Espermática.

Uno de los cambios en el espermatozoide debido a la capacitación espermática, es la hiperactivación (Figura 5). El espermatozoide experimenta una serie de cambios en su movimiento flagelar caracterizados por [7]:

- Movilidad no progresiva.
- Aumento en el movimiento y flexión del flagelo.

- Gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.
- Trayectoria irregular y tortuosa.

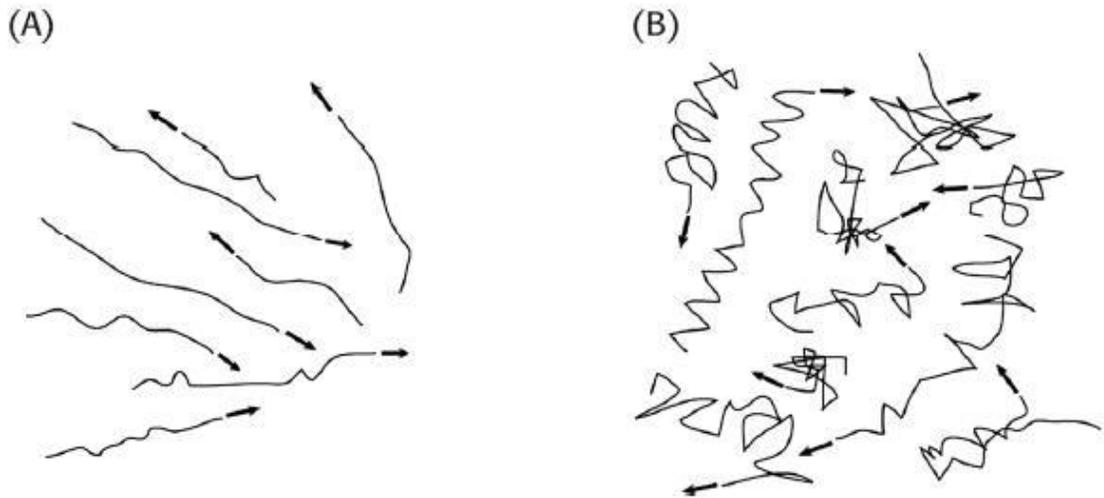


Figura 5. (A) Trayectoria sin hiper-activación, rectilínea (B) Trayectoria híper activada, irregular [7].

El motivo de la hiperactivación es que el espermatozoide debe generar la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y la inserción inicial en el ovocito [28].

De esta forma, los espermatozoides mantienen gradientes iónicos precisos a través de su membrana plasmática, mismos que son regulados por ATPasas dependientes de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , así la alteración en la concentración iónica activa enzimas del acrosoma y enzimas relacionadas con los cambios en la movilidad [29].

Para inducir la hiperactivación se requiere Ca^{2+} intracelular, elevación intracelular del AMPc y aumento del pH intracelular. La hiperactivación del flagelo se debe a que el Ca^{2+} se une a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, la cual se encuentra en la parte interna del flagelo [30].

Por su parte, la dineína es responsable de la conversión de energía química a partir de la hidrólisis de ATP en energía mecánica para la movilidad [7]. El Ca^{2+} puede provenir de diversos lugares, como (Figura 6) [29]:

- a) Reservas intracelulares, mediadas por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) en el retículo endoplasmático.
- b) Mitocondria.
- c) Extracelular (sistemas de transporte Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$).

Es importante destacar que la albúmina presente en el tracto reproductor de la hembra remueve el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, modificando así sus propiedades, este hecho también puede activar directamente canales iónicos, aumentando de esta manera las concentraciones de Ca^{+2} intracelular [31].

De igual forma, se ha descrito la posible participación de un cotransportador (NBC, por sus siglas en inglés ***Na⁺/Bicarbonate Cotransporter***) posiblemente activado por el Ca^{+2} extracelular, el cual favorece la entrada de Na^+ y HCO_3^- , donde este último resulta fundamental para la activación de la enzima ACs, la cual se encuentra soluble en el citosol, de esta manera aumenta la producción de AMPc [31].

Así mismo, se ha reportado un canal (sNHE, por sus siglas en inglés ***Na⁺/Hydrogen Exchanger***) que funciona intercambiando Na^+ y H^+ que, en conjunto con un canal específico de protones (H_v) regulado por el Zn^{+2} , elevan el pH intracelular; dicho aumento es relevante ya que puede activar canales iónicos (Ca^{+2} , Cl^- y K^+) favoreciendo la hiperactivación. Al mismo tiempo, el aumento en los niveles de AMPc activa a la PKA, estimulando la

TK, y ésta a su vez, la fosforilación de tirosinas, proceso que se asocia con la capacitación espermática (Figura 6) [31].

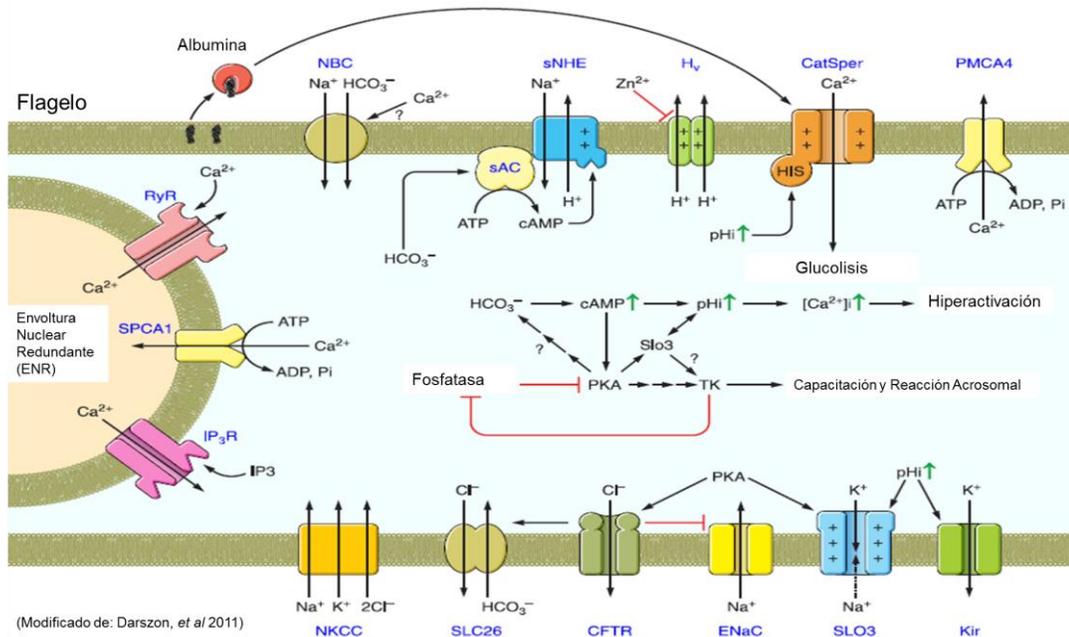


Figura 6. Acontecimientos que suceden durante la capacitación espermática y reacción acrosomal [31].

VII. Reacción Acrosomal.

a. Definición.

Se puede definir como la unión de las membranas plasmática externa y acrosomal externa del espermatozoide con la membrana de la ZP del ovocito en múltiples sitios, los cuales son especie específicos, liberando así el contenido, principalmente de enzimas hidrolíticas al medio externo, permitiendo de esta forma el paso de espermatozoide a través de la ZP (Figura 7) [19].

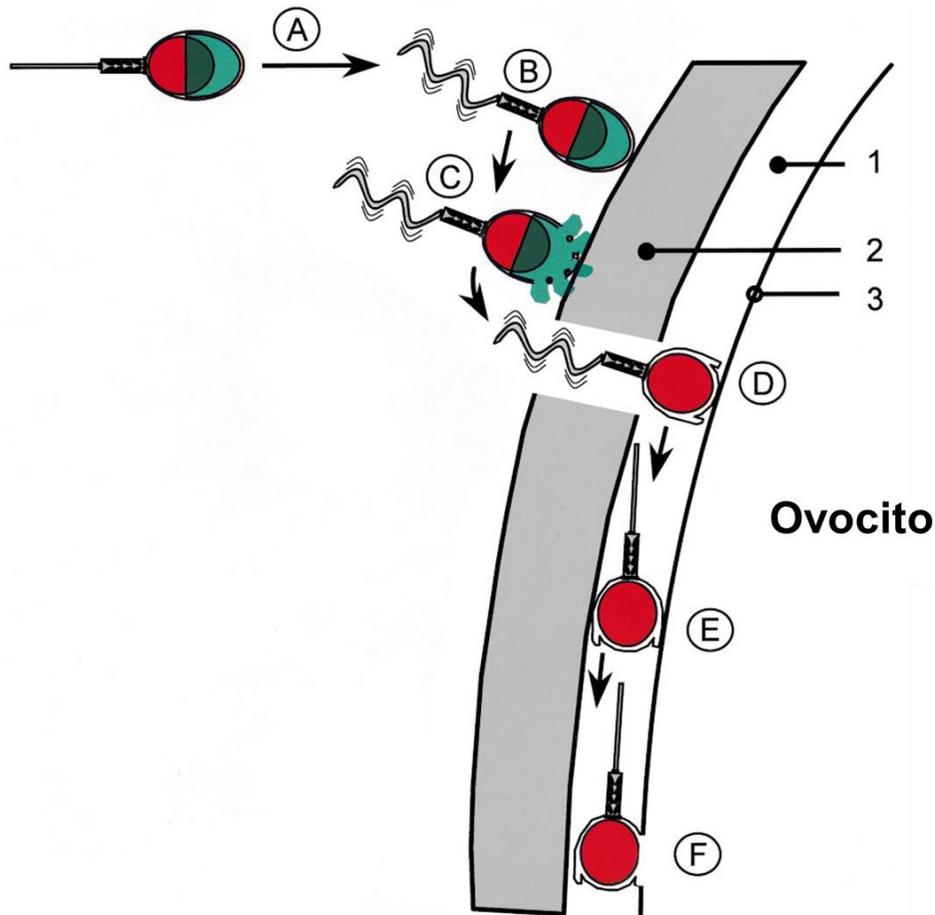


Figura 7. Secuencia de la reacción acrosomal. (A) Espermatozoide recién eyaculado. (B) Espermatozoide hiperactivado capaz de unirse a la matriz extracelular, también llamada zona pelúcida (ZP). (C) La unión del espermatozoide a la ZP desencadena la reacción del acrosoma y liberación de enzimas acrosómicas. (D) Enzimas hidrolíticas secretadas por el acrosoma del espermatozoide degradan la ZP, para posteriormente entrar en el espacio perivitelino. (E) Estructura en horquilla. (F) Fusión del espermatozoide con el oolema del ovocito. 1: Espacio perivitelino; 2: Zona Pelúcida; 3: Oolema (membrana plasmática del ovocito) [25].

b. Cambios Durante la Reacción Acrosomal.

La progresión del espermatozoide a través de la ZP es facilitada por la existencia de sitios de unión específicos entre la membrana acrosomal interna y las proteínas de la ZP que conducen al espermatozoide hasta el espacio perivitelino del ovocito, quedando así en contacto la región ecuatorial con la membrana plasmática del ovocito, lo cual induce la penetración del espermatozoide al interior del citoplasma del gameto femenino; sin embargo, la RA también puede ocurrir de forma espontánea, incluso cuando el espermatozoide está aún en el epidídimo [13, 32].

Los mecanismos que provocan la RA no están del todo dilucidados, sin embargo, se ha encontrado actividad de cinasas, aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} y aumento del pH intracelular [31, 33]. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de Ca^{2+} es sumamente importante para procesos fisiológicos en el espermatozoide y la RA no es la excepción [31, 34].

Es importante destacar que antes de que ocurra la RA, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática son independientes y mediante una estructura de filamentos de F-Actina se mantienen separadas, evitando que se fusionen y libere el contenido acrosomal antes de tiempo [29, 35].

La polimerización de la actina depende de la activación de fosfolipasa D (PLD), a través de la vía de HCO_3^- / AMPc / PKA por activación del receptor acoplado a proteína G (GPCR), del ácido lisofosfatídico (LPA) o su

receptor (LPA-receptor), así como de la vía proteína cinasa C (PKC). Se ha reportado que el espermatozoide posee receptores a LPA, los cuales al ser activados por su ligando, resultando en la activación de la PKC, aumentando los niveles de Ca^{+2} intracelular, y activan la polimerización de la actina dependiente de PLD. Por otro lado, la MAP-cinasa (MAPK), la TK, y el factor de ADP-ribosilación (ARF) están implicados en la activación PLD, lo que lleva a la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) para producir ácido fosfatídico (PA), el cual regula la polimerización de la G-actina a F-actina. De igual forma, la fosfolipasa C (PLC) hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e IP_3 , por su parte el DAG activa a la PKC y el IP_3 favorece la salida de Ca^{+2} de los reservorios del retículo endoplasmático, resultando en un aumento del Ca^{+2} intracelular; todas las vías anteriormente descritas están involucradas en los procesos de capacitación espermática y RA (Figura 8) [35].

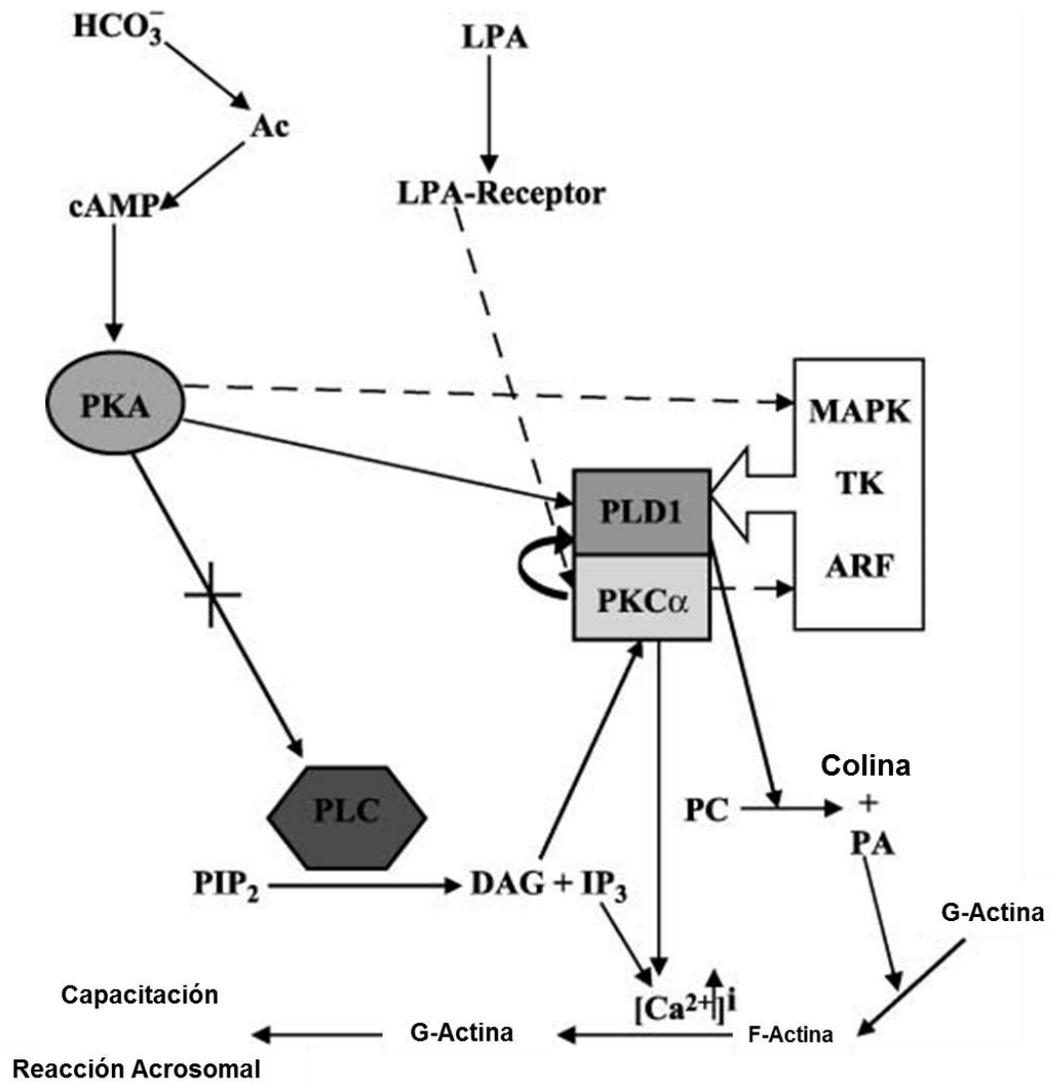


Figura 8. Remodelación de la Actina en el espermatozoide: Fosfolipasa D (PLD), proteína cinasa A (PKA), receptor acoplado a proteína G (GPCR), ácido lisofosfatídico (LPA), receptor ácido lisofosfatídico (LPA-receptor), proteína cinasa C (PKC), MAP-cinasa (MAPK), tirosina cinasa (TK), factor de ADP-ribosilación (ARF), fosfatidilcolina (PC), ácido fosfatídico (PA), la fosfolipasa C (PLC), fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP_3) [35].

Como se había mencionado previamente, estos procesos son dependientes de reacciones de óxido-reducción donde el papel del glutatión pudiera ser fundamental.

VIII. Participación de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en la Capacitación.

Las ERO, son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado [36-38], en el espermatozoide se han descrito dos fuentes principales: la mitocondria y la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH oxidasa). Sin embargo, la NADPH oxidasa alcanza su actividad máxima en espermatozoides testiculares, y disminuye gradualmente conforme avanza la maduración espermática en el epidídimo, esto nos quiere decir que uno o varios factores para la actividad de la NADPH oxidasa, aparentemente, se encuentran ausentes en espermatozoides epididimarios. Por lo que la participación de las ERO en espermatozoides, producto de la actividad de NADPH oxidasa, es inversamente proporcional a su estado de maduración, teniendo como fuente principal la mitocondria. Aunque ya existen reportes de la actividad de la NADPH oxidasa (Nox5) como una fuente importante de ERO en espermatozoides de humano [36, 39-41].

La fuente de la producción de ERO en espermatozoides humanos no se ha aclarado totalmente. Sin embargo, recientemente se detectó Nox5 en espermatozoides humanos, informándose de la generación de ERO por esta enzima, además otro estudio reporta la presencia de Nox5 en eyaculado de humano y la relacionan con anomalías morfológicas, correlacionando positivamente la generación de ERO con la actividad de Nox5 [41, 42].

Diferentes estudios han demostrado que la *diphenylene iodonium* (DPI) inhibe la fosforilación de tirosina en espermatozoides de ratón, toro,

hámster y humano [43-50]. Debido a que DPI es un inhibidor muy potente de NADPH, los resultados evidencian su participación en la capacitación espermática, pero también es un inhibidor de la generación de ERO mitocondrial [51].

Aunque varios grupos han confirmado que los espermatozoides de ratón, toro, hámster y humano contienen Nox5, no hay evidencia definitiva de la participación bioquímica de esta enzimas en la capacitación espermática, sin embargo, existen estudios donde relacionan a la Nox5, en espermatozoides de humano, con la movilidad de estas células, reportando que la actividad de Nox5 aumenta las concentraciones de Ca^{+2} intracelular y también podría estar implicada en la activación de cinasas [41].

Se ha descrito que el espermatozoide humano tiene toda la maquinaria necesaria para la producción de ERO, esta producción se da en cantidades controladas para que las ERO sean funcionalmente importantes para el espermatozoide, ya que se han relacionado directamente en la fosforilación de tirosina asociada con la capacitación espermática [52]. Sin embargo, cuando la producción de ERO excede las defensas antioxidantes del espermatozoide se presenta estrés oxidante [52].

No obstante, en concentraciones fisiológicas, puede inducir la capacitación espermática, la RA, y la fosforilación de tirosina, en humanos, equinos, rata, ratón y toro; sin embargo, la capacitación espermática en la especie porcina es aún material de estudio [53].

Con respecto a lo anterior, el sistema primario de defensa en contra de las ERO es el sistema enzimático antioxidante compuesto por la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) [54-56]. La GPX es una de las enzimas antioxidantes que se encarga de metabolizar el H_2O_2 endógeno, usando como sustrato al GSH y que, por acción de esta enzima, es oxidado (GSSG), y que posteriormente se reduce por la enzima glutatión reductasa (GR) para que la GSH vuelva a tener actividad antioxidante, proceso conocido como *ciclo redox* [9, 57].

Se ha reportado que diversas fases de la maduración de los espermatozoides dependen de la oxidación de moléculas a cargo de las ERO [27], dentro de estos procesos encontramos la capacitación y RA de los espermatozoides [58]. Dichos procesos se han asociado con un aumento en la fosforilación de tirosina, donde las ERO estimulan directamente a la enzima ACs y a la TK e inhibe a la TP [27].

El delicado balance entre el papel nocivo y el papel fisiológico de las ERO, requieren de un sistema de control fino para mantener el equilibrio redox, como el sistema: GPX/GR/GSH [27].

a. Radicales Libres y ERO

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son metabolitos que se derivan de la reducción del oxígeno, incluyendo radicales libres, tales como el $O_2^{\cdot-}$ o el hidroxilo ($\cdot OH$), también tenemos el H_2O_2 , que, aunque no es un radical libre, si es considerada como una ERO. De igual forma, tenemos especies moleculares derivadas de la reacción del carbono con O_2 , como:

radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) e hidroperóxidos orgánicos (ROOH). ERO también puede incluir otros oxidantes tales como peroxinitrito (ONOO^-) o ácido hipocloroso (HOCl), así como óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) [59].

Ahora bien, los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, esta característica los hace altamente reactivos, buscando a otros electrones para estabilizarse. Debido a lo anterior, los radicales libres y las ERO tienen la capacidad de reaccionar con diferentes biomoléculas incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos modificando de esta forma su estructura. [52, 59].

Como se ha descrito previamente las ERO son producidas de forma intrínseca por el espermatozoide teniendo como fuente principal la mitocondria [39, 40, 52]. Se ha reportado que la acción de las ERO en los espermatozoides podría ser el desacoplamiento del transporte de electrones y la fosforilación, dando como resultando espermatozoides con problemas para producir ATP, afectando de esta manera su movilidad [60]. Es probable que el H_2O_2 sea el responsable del daño a la estructura y función del espermatozoide debido a su alta permeabilidad y a la abundancia de la SOD mitocondrial y citoplasmática en mamíferos [60]. De igual manera se ha descrito que el estrés oxidante es causado por el desequilibrio entre la producción de ERO y moléculas antioxidantes responsables de su neutralización y eliminación [61]. Los espermatozoides de cerdo son particularmente susceptibles a los efectos adversos causados por las ERO debido al elevado nivel de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la

membrana plasmática [62], además de que afectan de manera negativa al ADN, movilidad y morfología del espermatozoide [61].

Así mismo, se ha reportado que el proceso de congelación/descongelación genera ERO, asociado a estrés térmico. Al respecto se ha reportado en cerdo y en toro que un desequilibrio entre ERO y anti-ERO afectan en particular el proceso de capacitación espermática de forma negativa, ya que se sabe que para que dicho proceso se lleve a cabo de forma fisiológica debe existir un efecto redox controlado [63, 64].

En contraparte, también se ha descrito la participación de las ERO en forma positiva. Se sabe que los espermatozoides testiculares no se pueden mover progresivamente, sino hasta su paso por el epidídimo, en este proceso las ERO podrían estar estimulando a la ACs para la formación de AMPc, favoreciendo de esta manera la fosforilación, resultando en un cambio de movilidad no progresiva a progresiva del espermatozoide [27].

b. Participación de las ERO en la Capacitación.

Se ha observado también un efecto positivo en la capacitación espermática, dicho proceso se realiza dentro del tracto reproductor femenino, la capacitación es una serie de cambios bioquímicos que el espermatozoide debe experimentar para adquirir la hiperactivación. Dicho proceso se ha asociado con un aumento en la fosforilación de tirosina, donde las ERO estimulan directamente a la ACs y TK e inhibe a la TP [27].

Se ha descrito una vía de transducción de señales donde está involucrada la ACs, la cual es regulada mediante procesos de óxido-

reducción, debido a ello, la generación de ERO influye directamente en la fosforilación de la tirosina en los espermatozoides a través de su capacidad de influir en los niveles intracelulares de AMPc [59]. Este evento se ha descrito previamente en espermatozoides de diferentes especies de mamíferos.

De igual forma se ha reportado que el H₂O₂, puede aumentar la fosforilación de la tirosina a través de la inhibición de la enzima tirosina fosfatasa, esta última enzima contiene un residuo de cisteína que debe permanecer en un estado reducido para tener actividad, sin embargo, al presentarse el H₂O₂ dicha enzima se oxida y pierde actividad [27, 53, 59].

En el espermatozoide de cerdo se ha reportado que estimulando la síntesis de AMPc se puede inducir la activación de la PKA y la fosforilación de serina/treonina, para posteriormente continuar con la fosforilación de los residuos de tirosina. Las posibles funciones de la fosforilación de tirosina dependientes de AMPc pueden incluir la activación de fosfolipasas vinculadas a la liberación de Ca⁺², ya que se piensa que el Ca⁺² al ser liberado de donde estaba almacenado viaja hasta la pieza de conexión para ser utilizado, esto último, así como la fosforilación en la pieza principal, en reportes recientes, lo han destacado como un paso crítico en la capacitación espermática [65-67].

IX. Sistemas Antioxidantes: Enzimático y No Enzimático

a. Enzimas Antioxidantes.

El sistema antioxidante enzimático del espermatozoide es fundamental para mantener un equilibrio entre especies oxidantes y anti-oxidantes, el sistema antioxidante enzimático se compone, como se mencionó antes, principalmente por las enzimas: SOD, CAT y GPX [38].

La SOD es la enzima encargada de transformar al anión súper oxido en una especie reactiva de una menor toxicidad, como es el H_2O_2 el cual posteriormente será transformado en agua por otras enzimas. Las SOD son una familia de enzimas, la primera SOD1, tiene en su centro catalítico un cobre y un Zn^{+2} que confiere estructura a la proteína, y se ubica en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y en la membrana externa mitocondrial. La segunda, SOD2, está localizada cerca de la membrana interna mitocondrial y posee un manganeso en su centro catalítico. La tercera SOD3, se encuentra en la matriz extracelular, y también se ha reportado en fluido linfático, plasma y líquido cefalorraquídeo, es una proteína tetramérica que posee un átomo de cobre y uno de Zn^{+2} por sub-unidad, y es la única proteína extracelular que puede eliminar el O_2^- [54].

La CAT es una enzima que descompone el H_2O_2 en agua y en O_2 , para ello, emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 una como agente reductor y otra como oxidante, en un principio, cualquier enzima que fuera capaz de llevar a cabo la reacción de CAT fue denominada como tal, sin embargo con el tiempo se fueron reportando diferencias entre enzimas, y de forma general

se han diferenciado tres tipos: CAT típica, CAT -peroxidasa y manganeso CAT [55].

Por su parte, la GPX es el nombre genérico de una familia de múltiples isoenzimas, que se caracterizan por su triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano, existen cinco isoenzimas en los tejidos de los mamíferos, todas dependientes de selenio. La GPX1 clásica o citosólica, GPX2 gastrointestinal, GPX3 plasmática, GPX4 en fosfolípidos y GPX5, esta última se ha reportado en la cabeza del epidídimo y en espermatozoides [68]. La GPX es una enzima que requiere de un tripéptido de bajo peso molecular llamado GSH para reducir el H_2O_2 en agua. El GSH es donador de equivalentes reductores en dicha reacción, de esta manera la reducción de H_2O_2 a agua y la oxidación de GSH a GSSG ocurre de forma simultánea [56, 69].

b. Sistema No Enzimático: Glutación.

Desde el punto de vista químico, el GSH es un compuesto de bajo peso molecular con un grupo sulfhidrilo (-SH). Se trata de un tripéptido (Figura 9) formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) también llamado L- γ -glutamil-cisteinil-glicina, la cual juega un papel decisivo en el mecanismo de defensa intracelular frente el estrés oxidante [70].

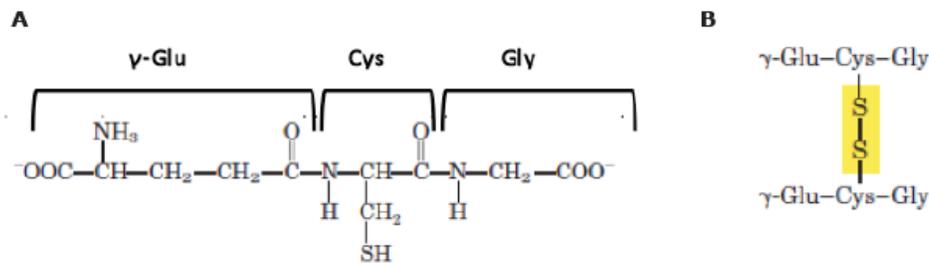


Figura 9. Representación de: A, estructura de aminoácidos glutatión reducido (GSH) y B, glutatión oxidado (GSSG). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. En el caso del GSSG son dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas [71].

La concentración de glutatión se encuentra en el rango de 1 a 11 mM en células de mamíferos [72, 73]; estudios más especializados han reportado una concentración de GSH en cerdo de: $3.84 \pm 0.21 \text{ nM}/10^8$ espermatozoides y en humano de: $4.47 \pm 0.46 \text{ nM}/10^8$ espermatozoides [74, 75].

Del mismo modo, se ha informado que la concentración citosólica de GSH en células de mamíferos representa entre el 70 y el 85% mientras que la concentración nuclear y mitocondrial representan entre el 15 y el 30% restante, de igual manera han reportado un pequeño porcentaje en retículo endoplásmico [72, 73].

Asimismo el GSH tiene importantes funciones como antioxidante, es parte fundamental de la detoxificación de xenobióticos así como también sirve para el almacenamiento y transporte de cisteína [71].

Por otro lado, el GSH es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que su disminución es permisiva

para la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis. Una función muy importante del GSH es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas, y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular; un ejemplo de esto es la PKC y PKA [71].

El GSH es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas: γ -glutamil-cisteína (γ -GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés) que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína, dicha enzima es considerada como un paso limitante en la síntesis de glutatión, posteriormente la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa, forma GSH. El trifosfato de adenosina (ATP) es donador de energía para ambas enzimas. Las concentraciones intracelulares de GSH son reguladas por la inhibición de la GCL por el producto final, GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo (Figura 10) [70, 71, 73].

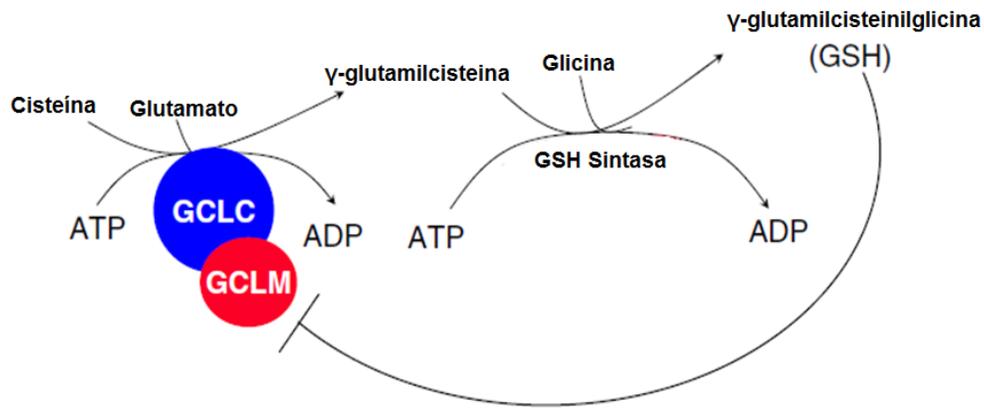


Figura 10. Síntesis de Glutati3n. Enzimas GCLC=Glutamato Cisteína Ligasa sub-unidad catalítica, GCLM=Glutamato Cisteína Ligasa sub-unidad reguladora, GSH=Glutati3n reducido [71, 73].

c. Metabolismo del Glutati3n.

Durante la detoxificaci3n de las ERO, el GSH est3 involucrado en dos tipos de reacciones: la interacci3n no enzimática con radicales como el O_2^- , 3xido nítrico y OH^\bullet ; otra reacci3n en la que participa es proporcionando un electr3n para la reducci3n de per3xidos en la reacci3n catalizada por la GPx [57]. El producto final de la oxidaci3n del GSH es glutati3n oxidado (GSSG) regenerado por la GR, enzima que transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciéndose a $NADP^+$. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR el GSH no es degradado ya que es reciclado y así puede ser utilizado cuando se requiera (Figura 11) [76].

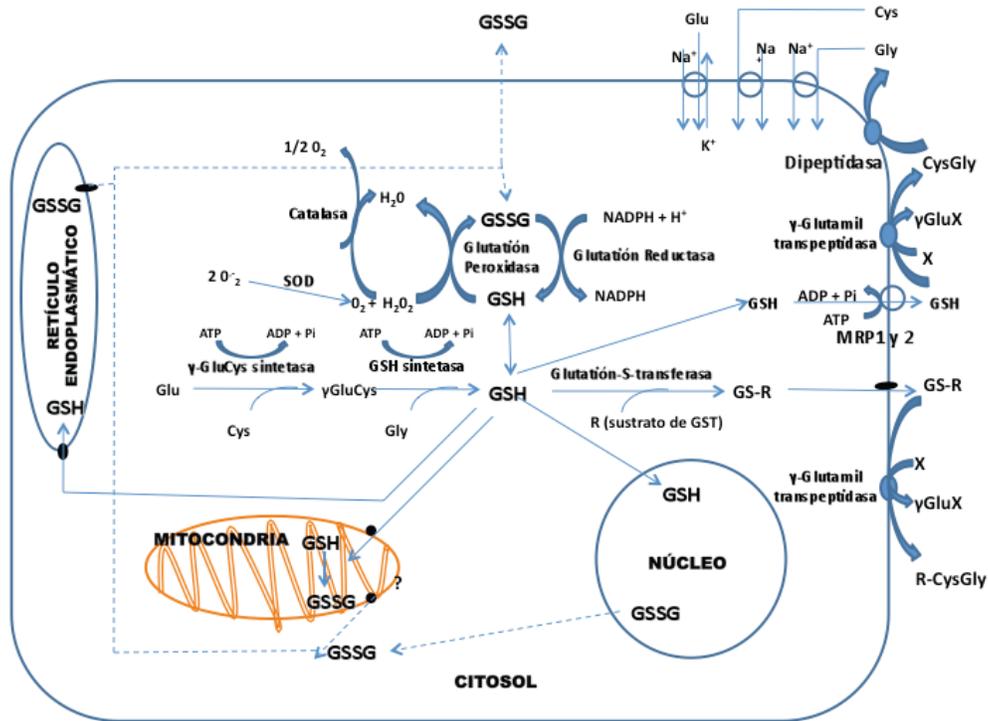


Figura 11. Metabolismo del glutatión [71].

Por otro lado, durante la generación de conjugados S-glutatión por las glutatión S-transferasas (GST) o por la liberación de GSH por las células, el nivel total de GSH disminuye dentro de las células, por lo tanto, el GSH utilizado para esos procesos tiene que ser remplazado por síntesis *de novo* (Figura 11) [76].

Por lo tanto, el GSH extracelular y los conjugados S-glutatión son sustratos para la enzima γ-glutamil transpeptidasa (γ-GT), la cual cataliza la transferencia del γ-glutamilo del GSH (o de los conjugados S- glutatión) a una molécula aceptora y, por lo tanto, genera el dipéptido cisteinilglicina (o el conjugado S-cisteinilglicina) y el γ-glutamilo conjugado. El dipéptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas de cisteína y glicina,

aminoácidos que posteriormente pueden ser transportados por la célula a través de transportadores específicos y participar en la síntesis *de novo* de GSH [76].

X. Antecedentes.

Cuando las células espermáticas son liberadas del testículo, su núcleo está sumamente empaquetado para realizar actividad transcripcional, no obstante, estas células presentan profundos cambios durante su paso por el epidídimo (maduración espermática epididimaria), por el tracto reproductor femenino (capacitación) y en el momento previo a la fertilización (reacción del acrosoma) [77]. Estos cambios podrían conseguirse por modificaciones en las proteínas existentes que, a su vez, podrían ser moduladas por señales originadas desde los diferentes ambientes espermáticos, de esta manera la fisiología de los espermatozoides dependerá de complejas redes de señales intra- y extracelulares [77].

Entre las señales extracelulares que más se conocen, se encuentran la participación de citocinas, hormonas y neurotransmisores que se unen a receptores específicos de la superficie celular, mismas que al unirse con sus receptores pueden generar varios tipos de señales intracelulares como cambios en la concentración de iones, activación de proteínas G, como la guanosina monofosfato cíclica (GMPc) y activación de cinasas PKA y PKC. Estos cambios, a su vez, provocarán la liberación de segundos mensajeros: AMPc, Ca^{2+} y metabolitos de fosfolípidos y la fosforilación de proteínas;

procesos que resultan esenciales para las diversas funciones celulares, en el caso del espermatozoide para adquirir su capacidad fertilizante [77, 78].

Las ERO se encuentran entre las moléculas que intervienen en la función espermática durante su tránsito desde el testículo hasta el ovocito y que son producidas por los mismos espermatozoides; por tal motivo los antioxidantes, entre los que se encuentra GSH/GPX, pueden retrasar o inhibir la oxidación, por lo tanto, pudieran funcionar como reguladores celulares [79].

Se ha observado que las ERO participan en la fosforilación de tirosinas, influyendo directamente en los niveles intra-celulares del AMPc, gracias a la estimulación de la ACs y por consecuencia la fosforilación de tirosina [58]. Además de que el H_2O_2 puede aumentar la fosforilación de tirosina a través de la inhibición de la actividad de la TP [80]. La capacitación y RA espermática dependen de una serie de eventos bioquímicos, en particular de la fosforilación de tirosina [27]. Por lo tanto las moléculas oxidantes como las ERO pueden cambiar la estructura de las proteínas alterando de esta manera su función [27].

El GSH se ha usado comúnmente para mejorar la calidad espermática, en espermatozoides de diferentes especies, sobretodo en espermatozoides congelados y usando diferentes concentraciones de GSH [63]. Sin embargo, el efecto positivo de ERO se ha determinado agregando moléculas que contrarresten su producción o su efecto, como algunos antioxidantes [63]. Un ejemplo de lo anterior es lo reportado por Gadea y

colaboradores en 2005, encontrando que el GSH puede tener un efecto contraproducente en la capacitación espermática cuando se agrega a concentraciones de 5mM en el espermatozoide de cerdo, reportando una disminución en espermatozoides viables capacitados con respecto al control y respecto a la concentración de 1mM; de igual forma reportan un aumento en espermatozoides muertos a concentración de 5mM, en contraste, reportan un elevado porcentaje de espermatozoides que penetran al ovocito con esta misma concentración [63]. En humano y en cerdo la concentración de GSH disminuye en espermatozoides congelados con respecto a espermatozoides frescos [74, 81] El sistema redox del espermatozoide resulta muy importante para su maduración, primero en el testículo, después en epidídimo y por último en el tracto reproductor de la hembra por lo tanto el GSH pudiera estar participando en la regulación de estos procesos.

Por tal motivo, en el presente trabajo se propone que el GSH pudiera servir como regulador en el proceso de capacitación.

XI. Justificación.

Se ha reportado el papel protector del GSH como antioxidante, sin embargo, en altas concentraciones como 5mM provoca la inhibición de la capacitación espermática. Por tal motivo, para que la capacitación se desarrolle correctamente, dependerá de que la concentración GSH esté en la concentración adecuada por lo que se puede especular que el glutatión tiene actividad reguladora ante dichos procesos.

Se ha explorado poco sobre el papel que pudiera tener el GSH en los mecanismos de la capacitación espermática. Por lo que es de relevancia el estudio para determinar el papel que tiene el GSH y de esta manera conocer los mecanismos mediante los cuales el GSH pudiera estar regulando la capacitación espermática y de esta forma proponer herramientas para el mejoramiento en los procesos de reproducción animal asistida.

XII. Pregunta de Investigación.

¿Cuál es el mecanismo mediante el cual diversas concentraciones de GSH regulan el proceso de capacitación en espermatozoides frescos de cerdo?

XIII. Hipótesis.

Si la concentración de GSH es importante para regular los procesos de fosforilación de tirosinas y formación de grupos sulfhidrilo en espermatozoides porcinos, entonces se deberá tener una concentración óptima de GSH que permita la capacitación espermática.

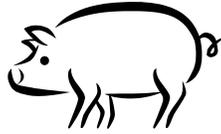
XIV. Objetivo General.

- Determinar los efectos de la adición de diferentes concentraciones de GSH en los procesos de fosforilación de tirosinas y formación de grupos sulfhidrilo asociados con la capacitación en el espermatozoide de cerdo.

XV. Objetivos Particulares.

- Analizar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de GSH sobre la capacitación espermática en muestras de cerdo.
- Analizar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de GSH sobre la formación de grupos sulfhidrilos.
- Analizar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de GSH sobre la fosforilación de tirosinas.
- Asociar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de GSH sobre la formación de grupos SH y la fosforilación de tirosinas con la capacitación de espermatozoides de cerdo.

XVI. Diseño Experimental.



Semen y Análisis seminal



Control	[GSH 0.5mM]	[GSH 1mM]	[GSH 5mM]
Capacitación	Capacitación	Capacitación	Capacitación
-SH	-SH	-SH	-SH
FT	FT	FT	FT

Dónde: [GSH]= Concentración de glutatión; -SH= Determinación de grupos Tio|; FT= Fosforilación de tirosina.

XVII. Material y Métodos.

Se utilizaron eyaculados frescos de verracos F2 línea maxter/pietrain de 1 año de edad y de fertilidad comprobada, provenientes de la empresa “Nutriservicios Ns Genética” ubicada en antiguo camino a la resurrección #1042 bodega-75 parque industrial la resurrección Puebla, Puebla, C.P. 72920 y de una granja de reproducción particular en Tláhuac. El eyaculado del cerdo fue obtenido por masturbación (técnica de mano enguantada), la porción gelatinosa se separó por filtración al momento de obtener la muestra y se eliminaron aquellas muestras que presentaron sangre u orina.

a. Espermatobioscopia.

La movilidad masal fue evaluada inmediatamente después en un microscopio de campo claro, determinando para movilidad masal 0= nula, 1= poca movilidad, 2= apariencia de olas y 3= apariencia de remolinos. Posteriormente la muestra fue transportada, cubierta de la luz, al Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, ubicada en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana. Almacenado a 17°C con diluyente Duragen de larga duración (10 días) [82, 83].

Al llegar al laboratorio se colocaron las muestras en “baño maría” con circulación de agua ajustado a 17°C, a continuación, se evaluó la vitalidad espermática mediante la técnica de Eosina al 1% Nigrosina al 10%, colocando en un portaobjetos 5µL de muestra y 5µL de Eosina-Nigrosina, se realizó un frotis y se dejó reposar 30 segundos posteriormente se observó en el microscopio de campo claro a 40X, reconociendo las células muertas teñidas en color morado y permaneciendo color blanco las células vivas. Se contaron 200 células y el resultado se expresó en porcentaje de viabilidad, con base en lo reportado previamente [82-84].

La concentración espermática se observó mediante la cámara de Neubauer, realizando dilución 1:100 con agua destilada. Posteriormente se colocaron 10µL de la dilución en la cámara de Neubauer y se observaron a 40X, realizando el conteo en 5 y 5 cuadrículas diferentes de cada lado de la cámara. El resultado se expresó en millones (1×10^6) de espermatozoides por mL [82].

La morfología (Figura 12) se analizó con base a la técnica de tinción de Papanicolaou para espermatozoides. Se tomaron alícuotas de 10µL de espermatozoides y 10µL de solución fijadora. Se colocó en un tubo cónico tipo Eppendorf, se agitó y se tomaron 10µL de esta solución. Se realizó un frotis que se dejó secar por 5 minutos. Se aplicó el siguiente tren de tinciones: solución Papanicolaou 1 (5 seg), enjuague con agua corriente, alcohol amoniacal (2 min), alcohol al 70%, alcohol al 96%, solución Papanicolaou 2 (1 min), alcohol al 96% (X2), solución Papanicolaou 3 (1 min), alcohol al 96%, alcohol al 100% y por último Xilol 5% [82].

Posteriormente se depositó una gota de “entellan” sobre la muestra y se colocó un cubreobjetos, las muestras se dejaron por 24 h, a temperatura ambiente, y se evaluaron las siguientes anomalías en microscopio de campo claro, empleando el objetivo100X [82, 85]:

- A) Anormalidades de cabeza
- B) Anormalidades en pieza media
- C) Anormalidades en flagelo
- D) Defectos de restos citoplasmáticos

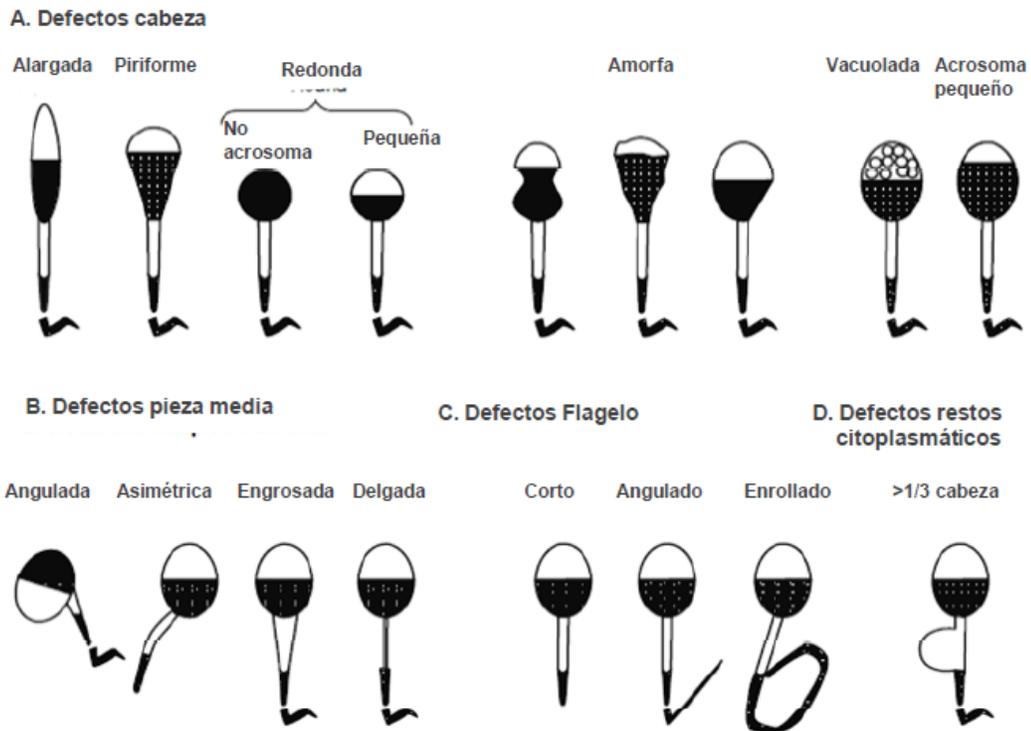


Figura 12. Clasificación de los defectos morfológicos en espermatozoides [82].

b. Determinación de la Capacitación Espermática.

Para la inducción de la capacitación, los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en 1mL y este procedimiento se repitió en 3 ocasiones, la primera en fresco y las dos posteriores con medio Ringer (NaCl 95mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1.7mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, ajustado a pH 7.2, en agua desionizada) a 600g x durante 10 min, ya lavados se resuspendieron en 1mL de medio capacitante Talp-Hepes (Tirodes albumina y lactato pirúvico) NaCl 116.0mM, KCl 3.1mM, Lactato sódico 21.7mM, MgSO₄ 0.4mM, NaH₂PO₄•H₂O 0.3mM, Glucosa 5.0mM, NaHCO₃, Piruvato Sódico 1.0mM, Hepes s/sodio 20mM, Rojo Fenol 334.38mM, suplementado con 3mg/mL de BSA (por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) y

1mM de piruvato sódico ajustado a pH 7.6 [86, 87]. Las alícuotas de semen (aproximadamente de 8×10^6 espermatozoides/mL) se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ / 95% aire, durante 4 h a 39°C. El porcentaje de espermatozoides capacitados se determinó mediante la técnica de clorotetraciclina (CTC), la cual consiste en resuspender los espermatozoides capacitados en un medio (CTC 750mM en NaCl 130mM, cisteína 5mM y 20mM Tris-Hcl ajustando a pH 7.8) y montados con solución Dabco (glicerol:PBS:9:1) se observaron directamente en microscopio de epifluorescencia (510nm), contando 200 células. Se diferenciaron los diferentes patrones de fluorescencia: generalizada (muerto) alta fluorescencia en región acrosomal y pieza media (capacitado) sin acrosoma o baja fluorescencia en acrosoma y pieza media (RA) [26, 86, 88, 89].

c. Fosforilación de Residuos de Tirosina.

La fosforilación de tirosinas fue localizada usando un anticuerpo monoclonal (2 µg/ml) anti-fosfoproteína tirosina conjugada con FITC (clone Py-20-FITC, Sigma Chemical Co.), en PBS conteniendo 0.1% BSA, por 5 minutos a temperatura ambiente. Un anticuerpo no específico (IgG2b, Sigma Chemical Co) fue usado como control para determinar las uniones no específicas. Las muestras marcadas fueron analizadas usando un citómetro de flujo modelo FACS-can (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, EUA). Para el análisis en el citómetro de flujo, se tomaron alícuotas de 1×10^6 espermatozoides y se evaluaron 20,000 células por muestra en cada una de las condiciones estudiadas. Los resultados

permitieron realizar los histogramas de intensidad de fluorescencia (IF) contra el número de células marcadas [90-93].

d. Cuantificación de Grupos SH.

El contenido de los grupos sulfhidrilo de las proteínas en los espermatozoides capacitados fue evaluado mediante el marcador fluorescente 5-iodo acetamido fluoresceína (5-IAF), las muestras seminales fueron de aproximadamente $5-10 \times 10^6$ de espermatozoides/mL, que fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos en 5 μ L de 5-IAF de una solución *stock* de 500 μ M y se analizó mediante citometría de flujo, con filtro de 525nm para 5-IAF, evaluando 20,000 eventos por muestra [63].

e. Análisis de Resultados.

Se realizó el análisis estadístico para comparar diferentes concentraciones de GSH y tiempos de incubación en medio capacitante mediante las pruebas de ANDEVA y HSD de Tukey.

XVIII. Resultados y Discusión.

El proceso de capacitación se ha descrito como una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que se producen en el espermatozoide, durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, para adquirir su capacidad fertilizante [31, 94-96]. Ahora bien, para que estos cambios en el espermatozoide se desarrollen de forma correcta, se ha descrito la importancia de las ERO en el proceso de capacitación espermática, reportando que pueden estimular a la enzima ACs para la síntesis de AMPc

y estimulando a las TK e inhibiendo a las tirosina fosfatasa, favoreciendo de esta manera la capacitación espermática [51].

En este trabajo nos enfocamos al sistema anti-oxidante no enzimático, particularmente estudiando al tripéptido glutatión en su forma reducida (GSH), ya que el GSH participa como sustrato de la enzima GPx, contribuyendo de esta manera a generar un equilibrio redox [9].

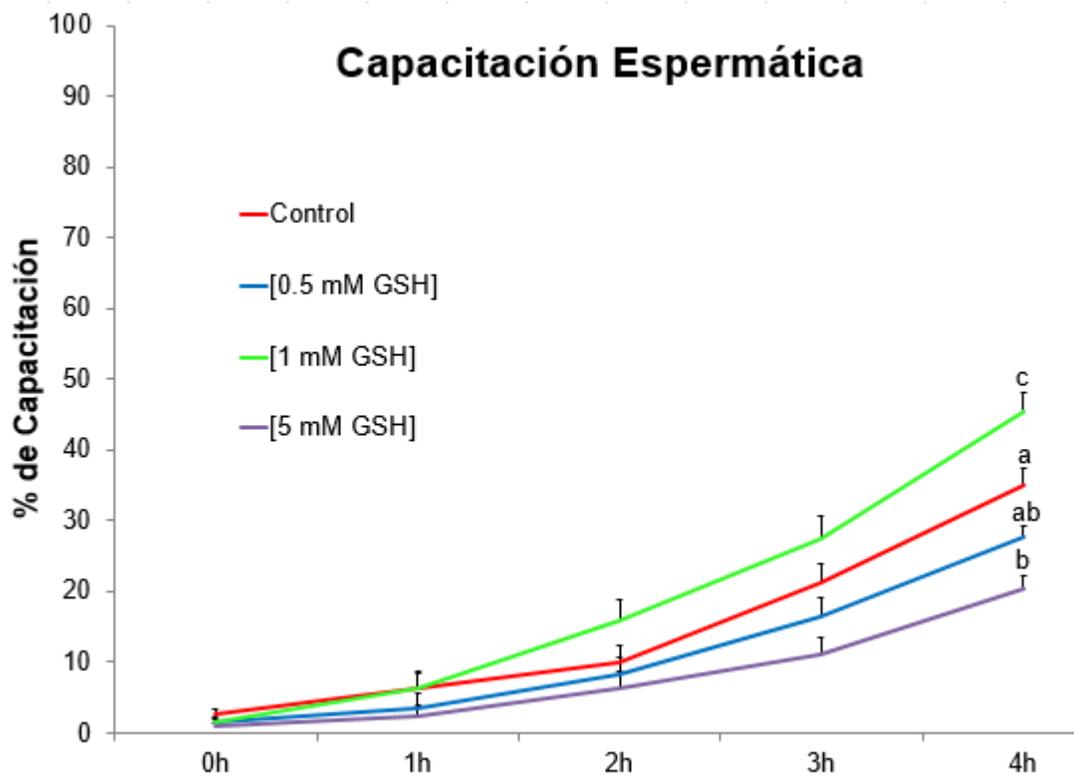
Los resultados de la Tabla 1 muestra el promedio y desviación estándar de los diferentes parámetros espermáticos. Cabe señalar que solamente se emplearon muestras que cumplieron con los parámetros descritos en la literatura.

Lo anterior se realizó para tener la mayor reproducibilidad posible, ya que se ha reportado que las diferentes anomalías en los espermatozoides pueden afectar su capacidad fertilizante y que una mejor calidad espermática favorece la reproducción [97], así mismo, se han publicado diversos parámetros reproductivos para el espermatozoide de cerdo [85, 97-99] y de esta forma poder homogeneizar y establecer los parámetros aceptables, ocupando muestras con una movilidad progresiva de $84 \pm 5\%$, vivos y muertos $92 \pm 2\%$, concentración de $210 \pm 60 \times 10^6$ y $3 \pm 1\%$ de anomalías morfológicas, es importante mencionar que se descartaron muestras con orina o sangre y se tuvo especial cuidado y atención en la calidad de las muestras, lo anterior para que no se vieran afectados nuestros resultados.

Tabla 1. Parámetros de inclusión y resultados de espermatobioscopias.

Análisis Seminal	Resultado	Parámetros	Ref. Bibliográfica
% de Movilidad Progresiva (Microscopía de campo claro)	84 ± 5%	>70% Progresiva	(Pichardo, <i>et al</i> 2005)
% Vivos y Muertos (Tinción Eosina-Nigrosina)	92 ± 2%	>91 ± 2% (Vivos)	(Bucci, 2012)
Concentración (Cámara de Neubauer)	210 ± 60 x10⁶	>25 x10 ⁶	(Suárez, 2006)
Morfología (Tinción de Papanicolau)	3 ± 1%	≤10% Anormalidades	(Gadea, 2002 / Čeřovský, 2005)

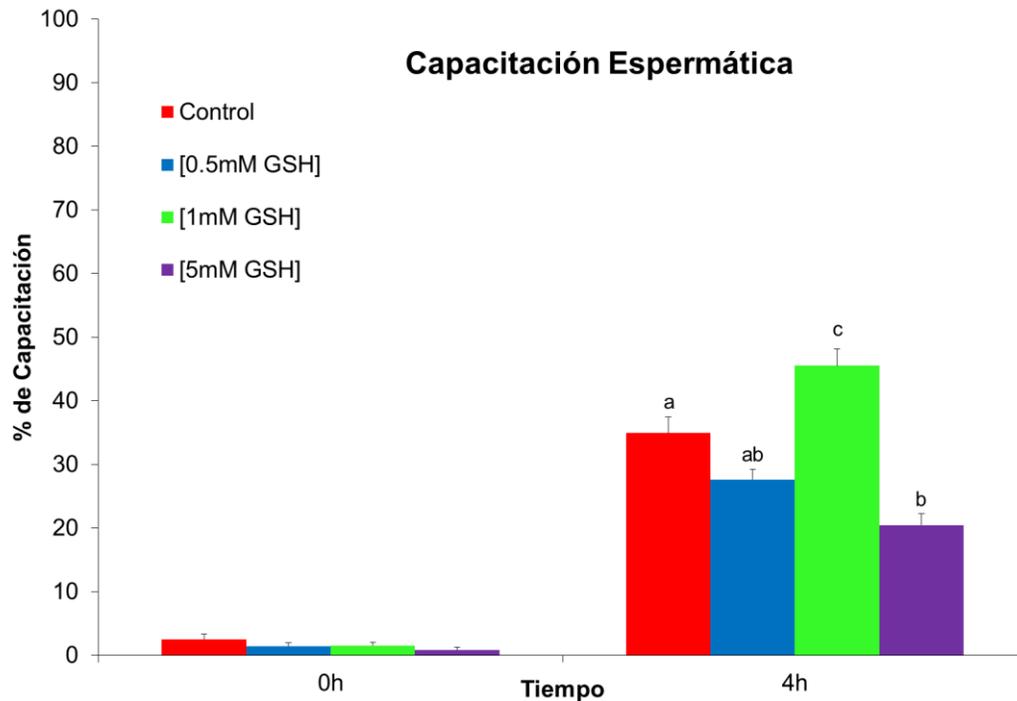
En la Gráfica 1 se puede observar la dinámica de cambio de la capacitación espermática en función del tiempo de incubación, donde el porcentaje de espermatozoides de cerdo capacitados e incubados con diferentes concentraciones de GSH aumenta conforme pasa el tiempo, sin embargo, el control (rojo) no muestra diferencia significativa en este aumento entre el tiempo inicial 0 (0h), tiempo 1 (1h), tiempo 2 (2h) y tiempo 3 (3h), por otro lado, en el tiempo 4 (4h) si aumento, además se observó un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados con la concentración de 1mM de GSH y un menor porcentaje de espermatozoides capacitados con la concentración de 5mM de GSH.



Gráfica 1. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de GSH sobre la capacitación espermática en función del tiempo. Porcentaje de capacitación espermática, en el tiempo inicial (0h) tiempo 1 (1h), tiempo 2 (2h) tiempo 3 (3h) y tiempo 4 (4h) utilizando diferentes concentraciones de glutatión GSH. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo tiempo. ANDEVA, Tukey. ($p < 0.05$) $n = 13$.

Cuando se compara el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de GSH sobre la capacitación espermática, como se muestra en la Gráfica 2, observamos que en la concentración de 1mM incrementa el porcentaje de capacitación ($p < 0.05$) en el tiempo 4 con respecto al control (0mM de GSH), mientras que en la concentración de 5mM disminuye el porcentaje de capacitación con respecto al control y a la concentración de 1mM mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$), por su

parte, la concentración de 0.5mM no mostro diferencias significativas con respecto al control y a 5mM, pero si frente a la concentración de 1mM.



Gráfica 2. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de GSH sobre la capacitación espermática, a las 4 horas de incubación. Porcentaje de capacitación espermática, en el tiempo inicial (0h) y después de 4 horas de incubación (4h) utilizando diferentes concentraciones de glutatión GSH. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo tiempo. ANDEVA, *Tukey*. ($p < 0.05$) $n = 13$.

Como se revisó en Ford 2004, varios autores aseveran que hay una importante participación de las ERO que resulta fundamental para el proceso de capacitación [27], lo anterior se confirmó con lo reportado por Gadea y colaboradores en 2005 [100], pues al adicionar diferentes concentraciones de GSH (1mM y 5mM) en medios de descongelación en espermatozoides de

cerdo, reportaron una disminución en el número de espermatozoides viables capacitados con una concentración de 5mM con respecto al control y a la concentración de 1mM, estos resultados corresponden con lo encontrado en el presente trabajo y, dado que nosotros trabajamos con semen fresco, sugiere que no es el efecto de la congelación sino la concentración de GSH lo que ocasiona que disminuya el porcentaje de espermatozoides capacitados.

De igual forma se ha reportado en espermatozoides congelados de cerdo que las concentraciones de GSH disminuyen [74], lo que podría estar afectando o favoreciendo al proceso de capacitación, ya que como se ha descrito, la capacitación está directamente relacionada con el balance entre las ERO y los anti-oxidantes. Dichos cambios se han observado a nivel de proteínas, las ERO oxidan los residuos de cisteína formando puentes disulfuro que modifican la estructura de las proteínas y su función, también se ha observado que pueden dimerizar a las cinasas y de igual forma activarlas o inactivarlas [27, 37].

El proceso de oxidación en el espermatozoide es necesario para la modificación de proteínas, y se han descrito también diferentes mecanismos como: oxidación de los grupos tiol de las proteínas formando un puente disulfuro, modificando de esta manera su estructura, así la proteína puede quedar activa o inactiva para comenzar o detener algún proceso [37].

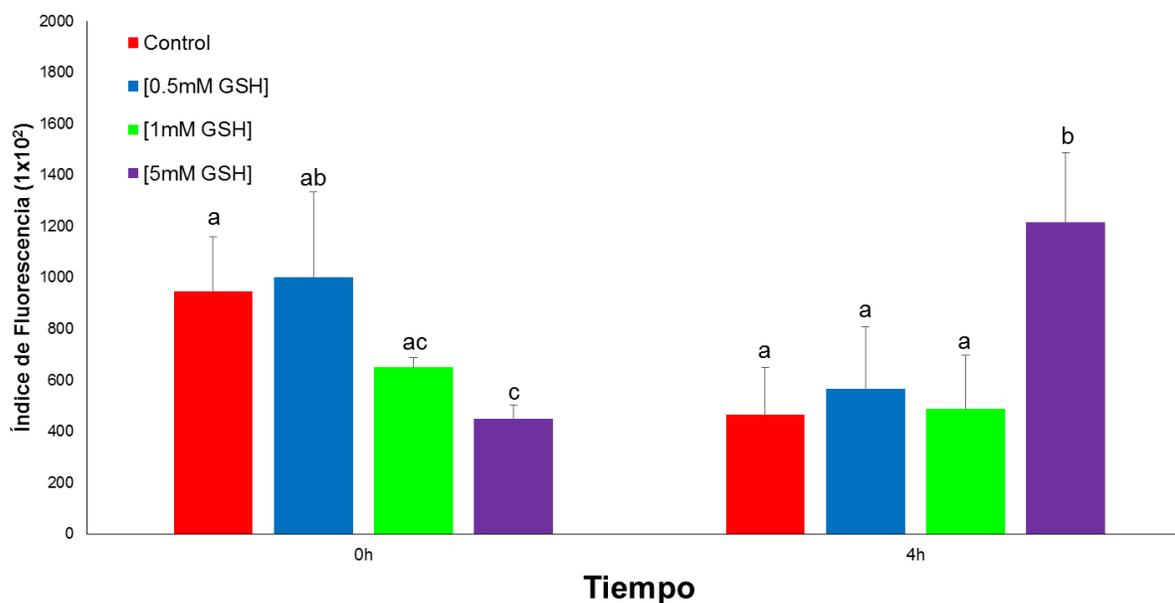
En este trabajo encontramos que, en la concentración de 5mM a las 4 horas de incubación, los grupos tiol de los espermatozoides capacitados

aumentaron, lo que corresponde con lo reportado en la literatura, ya que al no oxidarse los grupos tiol de las proteínas, el proceso de capacitación puede verse afectado, como se observa en la gráfica 2, cuando en la concentración de 5mM la capacitación espermática disminuye. De igual forma Aitken en el 2013 [51] reporta que la oxidación de los residuos de cisteína de las proteínas resulta crucial para la capacitación espermática.

En la Gráfica 3 podemos observar el porcentaje del índice de fluorescencia de los grupos sufhidrilos en los espermatozoides de cerdo. Donde se observa, en el tiempo inicial, una menor fluorescencia en los espermatozoides tratados con una concentración de 5mM, con respecto al control ($p < 0.05$). Sin embargo, a las 4 horas de incubación se aprecia un aumento en el índice de fluorescencia en este mismo tratamiento con respecto al control ($p < 0.05$).

Este aumento en los grupos sufhidrilos podría relacionarse directamente con una concentración alta de GSH (5mM), como fue lo realizado en el presente proyecto de investigación, ya que se ha reportado en diferentes trabajos que la capacitación espermática es dependiente de las ERO [37, 63, 101], y éstas al ser disminuidas por el sistema antioxidante del espermatozoide podría verse afectado el proceso de capacitación.

Índice de Fluorescencia SH



Gráfica 3. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de GSH sobre la presencia de grupos SH. Índice de fluorescencia de grupos SH en el tiempo inicial y después de 4 horas de incubación con diferentes concentraciones de GSH. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo tiempo. ANDEVA, *Tukey*. ($p < 0.05$) $n = 6$.

En la gráfica 4, se observa el porcentaje del índice de fluorescencia de la fosforilación de tirosinas. Donde se puede apreciar a las 4 horas de incubación que la concentración de 1mM nos muestra un índice de fluorescencia mayor, siendo este aumento en la fosforilación de tirosina estadísticamente significativo con respecto a los otros tratamientos y al control ($p < 0.05$) y coincide con un mayor porcentaje de capacitación espermática (gráfica 2).

Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por diferentes grupos de trabajo [27, 102-105], donde relacionan directamente la

fosforilación de tirosina con la capacitación espermática, observando que este fenómeno también sucede en espermatozoides de cerdo [65, 66, 103, 106].

Históricamente hablando, en 1989 se reportó por primera vez la fosforilación de tirosina en espermatozoides de mamífero, específicamente en ratón, encontrando por medio de un anticuerpo anti-fosfotirosina, una inmuno reactividad de una proteína en espermatozoides capacitados [107]. En 1991 reportaron este proceso en espermatozoides de otras especies como conejo, rata, ratón y humano [108]; hoy en día se ha descrito que la fosforilación es controlada por actividad de la proteína cinasa PKA, así como la desfosforilación por las fosfatasas, ambas funcionando como un interruptor a través del cual se puede activar o inactivar la función de diversas proteínas [105].

La fosforilación se produce en residuos de serina, treonina y posteriormente en tirosina y se relaciona directamente con el proceso de capacitación [105]. Se ha demostrado que la fosforilación de tirosina aumenta durante el proceso de capacitación [109], esto debido a la acción de la PKA dependiente de cAMP, lo cual apoya lo reportado en este trabajo.

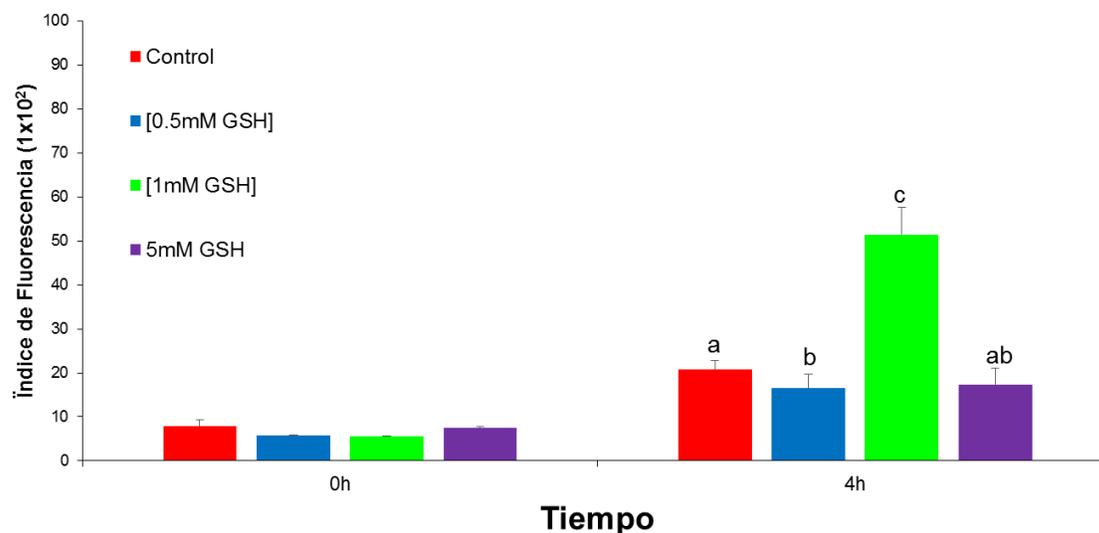
Lo que nos lleva a pensar que lo encontrado en este trabajo corresponde a lo reportado en la bibliografía, debido a que como podemos observar en la gráfica 4, el aumento de fosforilación que reportamos en espermatozoides capacitados con la concentración de 1mM podría ser el resultado de un equilibrio entre las ERO y el sistema antioxidante del

espermatozoide debido a una concentración óptima de GSH, favoreciendo de esta manera la acción de las ERO.

Asimismo, se ha reportado en espermatozoides de humano que la alteración en el proceso de fosforilación resulta en sub-fertilidad [110], sin embargo la fosforilación y su relación con el proceso de capacitación en espermatozoide sigue siendo material de estudio.

Con respecto a lo anterior, se podría especular que la concentración de GSH tiene un efecto bifásico, ya que a concentraciones altas como 5mM se presenta un efecto adverso para el espermatozoide, pudiendo inhibir a las ERO por su efecto antioxidante, afectando procesos como la capacitación, y a concentraciones bajas como 0.5mM parece no tener efecto sobre la célula, sin embargo, a concentraciones óptimas de 1mM como lo visto en este trabajo de investigación, el proceso de capacitación se ve favorecido, debido a que se mantiene en equilibrio el estado redox del espermatozoide.

Fosforilación de Tirosinas



Gráfica 4. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de GSH sobre la fosforilación de tirosinas. Índice de fluorescencia, a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de GSH. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo tiempo. ANDEVA, *Tukey*. ($p < 0.05$) $n=4$.

XIX. Conclusiones.

- Concentraciones óptimas de GSH (1mM) favorecen el proceso de capacitación en espermatozoides de cerdo. Mientras que concentraciones altas (5mM) o bajas (0.5mM) inhiben el proceso.
- Este mecanismo pudiera estar relacionado con la fosforilación de residuos de tirosina y la formación de grupos SH en el proceso de capacitación de espermatozoides frescos de cerdo.

XX. Referencias Bibliográficas.

1. O'Donnell, L., et al., *Endocrine Regulation of Spermatogenesis*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.*, J.D. Neill., Editor. 2006. p. 1017.
2. Cunningham, J.G. and B.G. Klein, *Fisiologia Veterinaria*. 4 ta ed. 2003.
3. Shalender Bhasin, G.S.B., *Male Sexual Function*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Editor. 2006. p. 1186.
4. Franca, L.R. and F.M. Cardoso, *Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar*. *Tissue Cell*, 1998. 30(5): p. 573-82.
5. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998. 25(7): p. 803-817.
6. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003. 35(10): p. 1271-1285.
7. Claude Gagnon and E.d. Lamirande, *Controls of sperm motility*, in *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Christopher J. De Jonge and C.L.R. Barratt, Editors. 2006. p. 108-133.

8. Medeiros, M.H.G., *Daño al DNA*, in *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*, M.K. Fainstein, Editor. 2008. p. 119.
9. Aitken, R.J. and S.D. Roman, *Antioxidant systems and oxidative stress in the testes*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2008. 1(1): p. 15-24.
10. Hermo, L., et al., *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*, 2010. 73: p. 243-278.
11. Kerr, J.B., et al., *Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Editor. 2006.
12. França, L.R., G.F. Avelar, and F.F.L. Almeida, *Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs*. *Theriogenology*, 2005. 63(2): p. 300-318.
13. Rosado-A., *Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitacion y la reaccion acrosomal*. *Arch Invest Med*. 19:253, 1988.
14. Cooper, T., *Epididymis*, in *Encyclopedia of reproduction*, J.D.N. E. Knobil, Editor. 1999. p. 1-17.

15. Robaire, B., B.T. Hinton, and M.C. Orgebin-Crist, *The Epididymis*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Editor. 2006.
16. Rago, V., et al., *Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007. 5: p. 23.
17. Rago, V., et al., *Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa*. *J Anat*, 2014. 224(6): p. 732-6.
18. Luconi, M., et al., *Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens*. *Steroids*, 2004. 69(8-9): p. 553 - 559.
19. Gadella BM, T.P., Boerke A, Brewis IA. , *Sperm head membrane reorganization during capacitation*. *Development Biol*. 52: , 2008: p. 473.
20. Parks, J.E. and R.H. Hammerstedt, *Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane*. *Biology of Reproduction*, 1985. 32(3): p. 653-668.
21. Naz, R. and R. Sellamuthu, *Receptors in spermatozoa: are they real?* *J Androl*, 2006. 27(5): p. 627 - 636.
22. Luño, V. and C. Matas, *Cambios en el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación*. *Cria y Salud Porcina*, 2012. 42: p. 38-49.

23. Matás, C., et al., *Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa*. *Theriogenology*, 2010. 74(8): p. 1327-1340.
24. Sutovsky, P. and G. Manandhar, *Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis*, in *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Christopher J. De Jonge and C.L.R. Barratt, Editors. 2006. p. 1-30.
25. Flesch, F.M. and B.M. Gadella, *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1469(3): p. 197-235.
26. Cervantes, M.I., et al., *Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*)*. *Syst Biol Reprod Med*, 2008. 54(4-5): p. 196-204.
27. Ford, W.C., *Regulation of sperm function by reactive oxygen species*. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(5): p. 387-99.
28. Tulsiani-DRP., *Glycan-Modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation*. *Mol y Cell Endocr* 250: 58., 2006.
29. Gadella-BM., *Sperm membrane physiology and relevance for fertilization*. *Anim. Reprod Sci.* 107., 2008: p. 229.

30. Inaba-K., *Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling*. Zool Sci. 20: 1043., 2003.
31. Darszon, A., et al., *Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa*. Physiol Rev, 2011. 91(4): p. 1305-55.
32. Flesch, F.M., et al., *Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane*. Journal of Cell Science, 2001. 114(19): p. 3543-3555.
33. Florman, H.M., et al., *A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels*. Biol Reprod, 1998. 59(1): p. 12-6.
34. Darszon, A., et al., *Ion transport in sperm signaling*. Dev Biol, 2001. 240(1): p. 1-14.
35. Breitbart, H., G. Cohen, and S. Rubinstein, *Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction*. Reproduction, 2005. 129(3): p. 263-8.
36. Arenas-Ríos, E., et al., *Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática*. Revista Iberoamericana de ciencias, 2014. 1: p. 73.

37. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(6): p. L1005-28.
38. Forman, H.J. and M. Torres, *Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(12 Pt 2): p. S4-8.
39. Murphy, Michael P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochemical Journal, 2009. 417(Pt 1): p. 1-13.
40. Aitken, R.J., K.T. Jones, and S.A. Robertson, *Reactive Oxygen Species and Sperm Function-In Sickness and In Health*. Journal of Andrology, 2012. 33(6): p. 1096-1106.
41. Musset, B., et al., *NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation*. J Biol Chem, 2012. 287(12): p. 9376-88.
42. Ghani, E., et al., *Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia*. Andrologia, 2013. 45(5): p. 351-6.
43. Aitken, R.J., et al., *Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function*. J Cell Sci, 1995. 108 (Pt 5): p. 2017-25.
44. Aitken, R.J., et al., *Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the*

- flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev, 1997. 47(4): p. 468-82.*
45. Aitken, R.J., et al., *A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 5): p. 645-56.*
 46. Aitken, R.J., et al., *Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. Free Radic Biol Med, 2004. 36(8): p. 994-1010.*
 47. Ecroyd, H.W., R.C. Jones, and R.J. Aitken, *Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation. Biol Reprod, 2003. 69(1): p. 347-54.*
 48. O'Flaherty, C., N. Beorlegui, and M.T. Beconi, *Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. Int J Androl, 2003. 26(2): p. 109-14.*
 49. Cordoba, M., N. Mora, and M.T. Beconi, *Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. Theriogenology, 2006. 65(4): p. 882-92.*
 50. Roy, S.C. and S.K. Atreja, *Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo*

- (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. Anim Reprod Sci, 2008. 107(1-2): p. 68-84.
51. Aitken, R.J. and B. Nixon, *Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored*. Mol Hum Reprod, 2013. 19(12): p. 785-93.
 52. Guthrie, H.D. and G.R. Welch, *Effects of reactive oxygen species on sperm function*. Theriogenology, 2012. 78(8): p. 1700-8.
 53. Awda, B.J., M. Mackenzie-Bell, and M.M. Buhr, *Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function*. Biology of Reproduction, 2009. 81(3): p. 553-561.
 54. Quiroz, L.E.G. and D.B.C. Bahena, *Superóxido Dismutasa*, in *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*, M.K. Fainstein, Editor. 2008. p. 169.
 55. Reyes, L.P., *Catalasa*, in *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*, M.K. Fainstein, Editor. 2008. p. 183.
 56. Cárdenas-Rodríguez, N., O.N. Medina-Campos, and J. Pedraza-Chaverrí, *Glutación Peroxidasas: Una Familia de Enzimas*, in *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas* M.K. Fainstein, Editor. 2008. p. 201.
 57. José C. Fernández Checa, C.G.R., *Glutación*, in *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*, M.K. Fainstein, Editor. 2008. p. 253.

58. Rivlin, J., et al., *Role of Hydrogen Peroxide in Sperm Capacitation and Acrosome Reaction*. *Biology of Reproduction*, 2004. 70(2): p. 518-522.
59. Aitken, R.J. and L. Bennetts, *Reactive oxygen species: friend or foe*, in *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, C.J.D. Jonge and C.L.R. Barratt, Editors. 2006: The Edinburgh Building, Cambridge.
60. Guthrie, H.D., G.R. Welch, and J.A. Long, *Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility*. *Theriogenology*, 2008. 70(8): p. 1209-15.
61. Walczak–Jedrzejowska, R., J.K. Wolski, and J. Slowikowska–Hilczer, *The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility*. *Central European Journal of Urology*, 2013. 66(1): p. 60-67.
62. Malo, C., et al., *Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*)*. *Cryobiology*, 2010. 61(1): p. 142-7.
63. Gadea, J., et al., *Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation*. *J Androl*, 2005. 26(6): p. 749-56.
64. Gadea, J., et al., *Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing*

- ability of frozen-thawed bull spermatozoa. International Journal of Andrology*, 2008. 31(1): p. 40-49.
65. Harayama, H., et al., *Relationship between cyclic AMP-dependent protein tyrosine phosphorylation and extracellular calcium during hyperactivation of boar spermatozoa. Molecular reproduction and development*, 2012. 79(10): p. 727-739.
66. Harayama, H., *Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. J Reprod Dev*, 2013. 59(5): p. 421-30.
67. Eddy, E.M., *The Spermatozoon*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Editor. 2006.
68. Vilagran, I., et al., *Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. Anim Reprod Sci*, 2015.
69. Arenas-Ríos, E., et al., *Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago corynorhinus mexicanus*, in *Fisiología reproductiva en mamíferos*. 2010. p. 187-208.
70. Sarrasague, M.M., et al., *Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2006. 40 (1): p. 45-51.

71. Martínez-Sámamo, J., P.V. Torres-Durán, and M.A. Juárez-Oropeza, *El Glutathion y Su Asociación Con Las Enfermedades Neurodegenerativas, La Esquizofrenia, El Envejecimiento Y La Isquemia Cerebral*. Revista Bioquímica UNAM, 2011. 30(2): p. 56-67.
72. Garcia-Gimenez, J.L., et al., *Nuclear glutathione*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1830(5): p. 3304-16.
73. Lu, S.C., *Glutathione synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1830(5): p. 3143-53.
74. Gadea, J., et al., *Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. Theriogenology, 2004. 62(3-4): p. 690-701.
75. Gadea, J., et al., *Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. Cryobiology, 2011. 62(1): p. 40-6.
76. Ralf, D., G.J. M, and H. Johannes, *Glutathione metabolism in brain*. European Journal of Biochemistry, 2000. 267(16): p. 4912-4916.
77. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* Journal of Neurochemistry, 2006. 97(6): p. 1634-1658.

78. Cisneros-Mejorado, A., et al., *Capacitation and Ca(2+) influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G*. *Andrology*, 2014. 2(1): p. 145-54.
79. Rodwell, V.W., *Oxidación Biológica*, in *Harper. Bioquímica Ilustrada.*, K.M.B.y.P.A. Mayes, Editor. 2007. p. 103.
80. Hecht, D. and Y. Zick, *Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H2O2 and vanadate In vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992. 188(2): p. 773-779.
81. Gadea, J., et al., *Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. *Cryobiology*, 2011. 62(1): p. 40-46.
82. WHO, *World Health Organization-Laboratory manual for the examination and processing of human semen-5th ed*. 2010.
83. Roca, J., et al., *Factors influencing boar sperm cryosurvival*. *J Anim Sci*, 2006. 84(10): p. 2692-9.
84. Swanson, E.W. and H.J. Bearden, *An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa*. *Journal of Animal Science*, 1951. 10(4): p. 981-987.

85. Cerovský, J., et al., *Changes in boar semen with a high and low level of morphologically abnormal spermatozoa*. Czech J. Anim. Sci, 2005. 50(7): p. 289-299.
86. Jimenez, I., et al., *Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa*. Theriogenology, 2003. 59(5-6): p. 1171-80.
87. Harrison, R.A., P.J. Ashworth, and N.G. Miller, *Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes*. Mol Reprod Dev, 1996. 45(3): p. 378-91.
88. Green, C.M., et al., *Stimulating effect of pyroglutamylglutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro*. Mol Reprod Dev, 1994. 38(2): p. 215-21.
89. Ded, L., et al., *Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. 8(1): p. 87.
90. Fierro, R., et al., *Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry*. Arch Androl, 1996. 36(3): p. 187-96.
91. Petrunkina, A.M., E. Jebe, and E. Topfer-Petersen, *Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa*. J Cell Physiol, 2005. 204(2): p. 508-21.

92. Piehler, E., et al., *Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation*. Cytometry A, 2006. 69(10): p. 1062-70.
93. Sidhu, K.S., et al., *A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*)*. Reproduction, 2004. 127(1): p. 95-103.
94. Olivera, M., et al., *El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 2006. 19: p. 426-436.
95. Visconti, P.E., et al., *Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation*. Asian J Androl, 2011. 13(3): p. 395-405.
96. Navarrete, F.A., et al., *Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways*. J Cell Physiol, 2015. 230(8): p. 1758-69.
97. Gadea, J., *Sperm under microscope. How to interpret boar sperm morphology when inspecting semen samples in the AI laboratory*. Pig International, 2002. 32 (9): p. 24-27.
98. Suarez, S.S., *Gamete and Zygote Transport*, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, Editor. 2006.

99. Bucci, D., et al., *Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa*. Theriogenology, 2012. 77(6): p. 1206-16.
100. Gadea, J., et al., *Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function*. Journal of Andrology, 2005. 26(3): p. 396-404.
101. Almog, T. and Z. Naor, *Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions*. Mol Cell Endocrinol, 2008. 282(1-2): p. 39-44.
102. de Lamirande, E. and C. O'Flaherty, *Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1784(1): p. 106-15.
103. Luño, V., et al., *Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models*. Reproduction, 2013. 146(4): p. 315-24.
104. Naz, R.K. and P.B. Rajesh, *Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction*. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 2004. 2: p. 75-75.
105. López-Úbeda, R. and C. Matás, *An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process*. Andrology-Open Access, 2015. 4(1).

106. Tardif, S., et al., *Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins*. Biol Reprod, 2001. 65(3): p. 784-92.
107. Leyton, L. and P. Saling, *95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding*. Cell, 1989. 57(7): p. 1123-30.
108. Naz, R.K., K. Ahmad, and R. Kumar, *Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function*. J Cell Sci, 1991. 99 (Pt 1): p. 157-65.
109. Signorelli, J.R., et al., *Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e81286.
110. Buffone, M.G., et al., *High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies*. J Androl, 2009. 30(5): p. 552-8.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00024

Matrícula 2113801593

EL PAPEL DEL GLUTATION
REDUCIDO (GSH) EN EL PROCESO
DE CAPACITACION EN EL
ESPERMATOZOIDE DE CERDO (Sus
scrofa domestica)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD AUTÓNOMA IZTAPALAPA

Dr. Pablo Gustavo Damian Matzumura

01 FEB 2016

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de enero del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
DRA. GISELA FUENTES MASCORRO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ERNESTO RODRIGUEZ TOBON

y de acuerdo con el artículo 79 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

A PROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ERNESTO RODRIGUEZ TOBON
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ACQUICIRA

PRESIDENTE

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

SECRETARIA

DRA. GISELA FUENTES MASCORRO