



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Doctorado en Ciencias en Biomedicina

“Efecto de hormonas esteroideas sobre la reacción acrosomal del  
espermatozoide humano”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma del Doctorado en  
Ciencias en Biomedicina

**Presenta:**

Sheini Ruturi Sánchez González

**Dirigido por:**

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie  
Presidente

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz  
Secretario

Dra. Esperanza Mata Martínez  
Vocal

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano  
Suplente

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Suplente

Centro Universitario  
Querétaro, Qro, México  
Noviembre 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto de hormonas esteroideas sobre la reacción  
acrosomal del espermatozoide humano

**por**

Sheini Ruturi Sánchez González

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** MEDCC-255644

## DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a Dios por haberme dado vida y salud para concluir esta etapa académica.

También le dedico este trabajo a mis padres porque gracias a ellos, pude mudarme a Querétaro para estudiar en la Facultad de Medicina y siempre me dieron su apoyo para que yo pudiera seguir preparándome. Siempre estaré agradecida con ellos por haberme dado todas las facilidades para estudiar. Mamá, papá, muchas gracias por nunca ponerme ningún límite cuando se trata de aprender y de prepararse más.

Finalmente, este trabajo me lo dedico a mí misma ya que me di cuenta que cuando uno quiere algo se puede lograr con empeño, trabajo y constancia.

*Todo tiene su momento, y cada cosa su tiempo bajo el cielo  
(Eclesiastés 3:1)*

*Dios es nuestro amparo y nuestra fortaleza, nuestra ayuda segura en  
momentos de angustia (Salmos 46:1).*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** por la fortaleza y sabiduría que me dio para cumplir con este objetivo.

A **mis padres** por ser los mejores y siempre darme sus consejos cuando los necesito y por brindarme su apoyo a lo largo de toda mi trayectoria académica.

A **Iván Rodríguez** porque desde que llegué a Querétaro, ha sido mi pilar en todos los aspectos y me ha dado su apoyo incondicional. Gracias por acompañarme siempre en mis momentos de alegría, de tristeza y de estrés durante todos estos años.

A mis amigas **Lorena García, Cinthia Lezama y Beatriz Artigas** por siempre darme apoyo moral, compartirme sus conocimientos y por todas las risas a lo largo de estos años.

A la **Dra. Guadalupe Zaldivar** por su gran empatía ya que sin su apoyo, este logro académico no habría sido posible.

A la **Dra Ana Sánchez** porque creyó en mí y me aceptó como su estudiante y gracias a ella, este proyecto se pudo realizar. Gracias por haber sido mi tutora de tesis y por todo el apoyo y conocimiento que compartió conmigo.

Al **Dr. Juan Carlos Solís** a quien estimo y admiro muchísimo por su conocimiento y por haber sido mi tutor de seguimiento durante todos estos años que estuve en la Facultad de Medicina.

Al **Dr Hebert Hernández** porque gracias al programa de Maestría en Ciencias en Neurometabolismo, ingresé a la Facultad de Medicina en donde continué con mis estudios de Doctorado.

A **Marina Cano** quien me apoyó en todos mis trámites administrativos y siempre fue muy amable y empática conmigo desde que la conocí; mil gracias por las atenciones y por la paciencia durante estos últimos meses.

A los alumnos del Verano de la Ciencia 2021, en especial a **Ailed Méndez** y a **Ángel Serratos** por su gran apoyo en la recolección de muestras y por todas las risas y buenos momentos que me hicieron pasar.

## RESUMEN

La infertilidad es una condición del sistema reproductivo que se caracteriza por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección. Un 30% de la infertilidad es debida a factores masculinos dentro los cuales una de las causas más frecuentes son alteraciones en los parámetros espermáticos; ya sea por calidad o cantidad. Una de las pruebas clásicas de laboratorio que se realizan para la determinación de estos parámetros es el espermiograma. Sin embargo, presenta la desventaja que no es capaz de predecir el potencial fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, existen pruebas funcionales como la reacción acrosomal (RA) la cual tiene un mayor poder predictivo para determinar qué tan hábiles pueden ser los espermatozoides para viajar hasta el óvulo y fecundarlo. Fisiológicamente, para que un espermatozoide pueda fecundar, requiere atravesar por los procesos de capacitación y RA. Ambos procesos tienen lugar en el tracto genital femenino. Durante el proceso de capacitación, el espermatozoide atraviesa por una serie de cambios bioquímicos que le van a brindar la capacidad para fecundar. Una vez que el espermatozoide se encuentra capacitado, entonces es apto para llevar a cabo la RA. Este es un proceso exocitótico dependiente de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en donde hay una liberación de enzimas hidrolíticas que le van a permitir al espermatozoide atravesar las capas que se encuentran rodeando al ovocito. Tanto en la capacitación como en la RA, participa CatSper; un canal iónico de  $Ca^{2+}$  que se expresa únicamente en el flagelo de los espermatozoides. Uno de los agonistas fisiológicos de CatSper es la hormona esteroidea progesterona (Pg). Sin embargo, existen escasos estudios y mucha controversia sobre el efecto que ejercen otras hormonas esteroideas como testosterona (T) e hidrocortisona (HC) en la fisiología del espermatozoide. Algunos estudios indican que la T e HC inhiben la activación de CatSper por Pg funcionando como factores anticapacitantes. Por otro lado, otros autores han reportado un efecto agonista sobre CatSper. Por ello, el objetivo de este estudio es analizar el efecto de diferentes concentraciones de ambas hormonas en el espermatozoide humano empleando pruebas funcionales como la RA. Estos resultados aportarán información valiosa para entender mejor la infertilidad.

**Palabras clave: reacción acrosomal, hormonas esteroideas, progesterona, testosterona, hidrocortisona, espermatozoide.**

## **ABSTRACT**

Infertility is a condition of the reproductive system characterized by the inability to achieve a clinical pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse. 30% of infertility is due to male factors, one of the most frequent causes being alterations in sperm parameters, either for quality or quantity. One of the classic laboratory tests performed to determine these parameters is the spermogram. However, it has the disadvantage that it is not capable of predicting the fertilizing potential of sperm. However, functional tests such as the acrosomal reaction (AR) have a greater predictive power to determine how capable sperm can be to travel to the egg and fertilize it. Physiologically, for a sperm to fertilize, it needs to go through the capacitation and RA processes. Both processes take place in the female genital tract. During the capacitation process, the sperm goes through a series of biochemical changes that will give it the ability to fertilize. Once the sperm is trained, then it can carry out the RA. This is a calcium-dependent process where there is a release of hydrolytic enzymes that will allow the sperm to pass through the layers that surround the oocyte. In the capacitation and the RA, CatSper participates, a channel expressed only in the flagellum of sperm. One of the physiological inducers of CatSper is the steroid hormone progesterone (Pg). However, there are few studies and much controversy about the effect of other steroid hormones such as testosterone and hydrocortisone. Some studies indicate that these hormones inhibit the activation of CatSper by Pg by functioning as anti-capacitating factors. On the other hand, other authors have reported an agonist effect on CatSper. Therefore, the objective of this study is to analyze different concentrations of both hormones but using functional tests such as RA. These results will provide valuable information to a better knowledge of infertility.

**Key words: acrosome reaction, steroid hormones, progesterone, testosterone, hydrocortisone, human sperm.**

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Infertilidad</b>	<b>14</b>
2.1.2 Métodos diagnósticos	14
<b>2.2 Espermatozoide</b>	<b>15</b>
2.2.1 Anatomía del espermatozoide	16
2.2.2 Espermatogénesis	20
2.2.3 Transporte del espermatozoide	21
2.2.3.1 Semen	22
2.2.3.1.1 Análisis del semen	23
<b>2.3 Capacitación espermática</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Reacción acrosomal</b>	<b>27</b>
2.4.2 Evaluación de la reacción acrosomal	29
2.4.2.1 Tinción con Azul de Coomassie	29
2.4.2.2 Tinción con FITC-PSA	30
<b>2.5 Canal de calcio de espermatozoide (CatSper)</b>	<b>32</b>
2.5.1 Estructura y regulación de CatSper	32
2.5.2 Expresión y localización de los genes que codifican para CatSper	36
2.5.3 Estímulos fisiológicos reguladores de CatSper	36
2.5.4 CatSper y hormonas esteroideas	36
2.5.4.1 Testosterona	38
2.5.4.1.1 Síntesis de la testosterona	38
2.5.4.1.2 Transporte de la testosterona	42
2.5.4.1.3 Regulación de la testosterona	42
2.5.4.2 Hidrocortisona	44
2.5.4.2.1 Síntesis de la hidrocortisona	44
2.5.4.2.2 Transporte de la hidrocortisona	46
2.5.4.2.3 Regulación de la hidrocortisona	46
2.5.4.3 Testosterona, hidrocortisona y su relación con CatSper	47
<b>2.6 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>2.7 HIPÓTESIS</b>	<b>51</b>
<b>2.8 OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
2.8.1 OBJETIVO GENERAL	51
2.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Diseño</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Definición de universo</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Tamaño de la muestra</b>	<b>52</b>

<b>3.4 Criterios de selección de participantes</b>	<b>52</b>
3.4.1 Criterios de inclusión	52
3.4.2 Criterios de exclusión	52
3.4.3 Criterios de eliminación	53
<b>3.5 Reclutamiento de participantes</b>	<b>53</b>
<b>3.6 Recolección de la muestra</b>	<b>53</b>
<b>3.7 Análisis macroscópico</b>	<b>53</b>
<b>3.8 Análisis microscópico</b>	<b>54</b>
<b>3.9 Preparación de la muestra de espermatozoides por método de “Swim up”</b>	<b>56</b>
<b>3.11 Inducción de la reacción acrosomal</b>	<b>58</b>
<b>3.12 Reacción acrosomal teñida con Azul de Coomassie</b>	<b>58</b>
<b>3.13 Reacción acrosomal teñida con FITC-PSA</b>	<b>59</b>
<b>3.14 Pruebas estadísticas</b>	<b>60</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Resultados de espermiogramas</b>	<b>61</b>
<b>4.2 Resultados de reacción acrosomal con Azul de Coomassie</b>	<b>62</b>
6.2.1. Testosterona	62
6.2.2. Hidrocortisona	65
<b>4.3 Resultados de reacción acrosomal con FITC-PSA</b>	<b>66</b>
4.3.1 Hidrocortisona	66
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>92</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1: Composición del semen.</b>	23
<b>Tabla 2: Parámetros normales del semen.</b>	24
<b>Tabla 3: Gen y localización de Catsper.</b>	36
<b>Tabla 4: Tratamiento de muestras con la técnica Azul de Coomassie.</b>	57
<b>Tabla 5: Resultados de espermiogramas</b>	61
<b>Tabla 6: Promedios de RA espontánea e inducida generadas por diferentes concentraciones de T en células espermáticas.</b>	64
<b>Tabla 7: RA neta generada por diferentes concentraciones de T en células espermáticas.</b>	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Anatomía del espermatozoide humano.</b>	19
<b>Figura 2: Síntesis del espermatozoide.</b>	21
<b>Figura 3: Transporte del espermatozoide.</b>	22
<b>Figura 4: Cambios en el batido flagelar del espermatozoide.</b>	26
<b>Figura 5: Reacción acrosomal del espermatozoide.</b>	28
<b>Figura 6: Formas del colorante Azul de Coomassie.</b>	29
<b>Figura 7: Evaluación del estado acrosomal con Azul de Coomassie.</b>	30
<b>Figura 8: Tinción FITC-PSA.</b>	31
<b>Figura 9: Complejo y estructura de CatSper.</b>	33
<b>Figura 10: Estructura de la testosterona.</b>	38
<b>Figura 11: Síntesis de la testosterona.</b>	41
<b>Figura 12: Regulación de la testosterona.</b>	43
<b>Figura 13: Estructura de la hidrocortisona.</b>	44
<b>Figura 14: Síntesis y regulación de la hidrocortisona.</b>	45
<b>Figura 15: Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper.</b>	47
<b>Figura 16: Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper.</b>	50
<b>Figura 17: Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper.</b>	50
<b>Figura 18: Método Swim up.</b>	56
<b>Figura 19: Reacción acrosomal con Azul de Coomassie.</b>	59
<b>Figura 20: Reacción acrosomal con FITC-PSA.</b>	60
<b>Figura 21: Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas en ausencia y presencia de testosterona.</b>	63
<b>Figura 22: Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas en ausencia y presencia de hidrocortisona.</b>	66
<b>Figura 23: Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas durante 2h y luego incubadas con HC 1h.</b>	67

## **ABREVIATURAS**

TGF: Tracto genital femenino

RA: Reacción acrosomal

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Concentración de calcio intracelular

Pg: Progesterona

T: Testosterona

HC: Hidrocortisona

μM: Micromolar

OMS: Organización Mundial de la Salud

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona Luteinizante

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

PRL: Prolactina

OH: Hidroxi

pH: Potencial de hidrógeno

ATP: Adenosín trifosfato

NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ACs: Adenilato ciclasa soluble

PKA: Proteína cinasa A

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonato

sNHE: Intercambiador sodio/potasio

SLO: Canal de potasio específico del espermatozoide

Hv1: Canal de hidrógeno dependiente de voltaje

Em: Potencial de membrana

mV: milivoltios

pHi: Potencial de hidrógeno intracelular  
FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*  
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico  
BSA: Albúmina sérica bovina  
MAP: Proteína cinasa activada por mitógeno  
PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa  
StAR: Proteína reguladora aguda esteroideogénica  
CYP450: Citocromo P450  
SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales  
HPG: Hipotálamo pituitaria gonadal  
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina  
CBG: Globulina de unión a cortisol  
HPA: Hipotálamo pituitaria adrenal  
CRH: Hormona liberadora de corticotropina  
ACTH: Hormona adrenocorticotropa  
ABHD2: Proteína 2 contenedora de dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa  
2-AG: 2-araquidonoilglicerol  
TGM: Tracto genital masculino  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
PBS: Buffer fosfato salino  
PKT: Proteína cinasa B  
PGE1: Prostaglandina E1  
EC50: Concentración efectiva máxima 50  
IC50: Concentración inhibitoria máxima 50

## 1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una condición del sistema reproductivo que se caracteriza por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (Zegers et al., 2009).

El 30% de la infertilidad es atribuida a factores masculinos dentro de los cuales una de las causas más frecuentes es la alteración en los parámetros espermáticos; ya sea por defectos en su calidad (movilidad o morfología anormal) o en la cantidad (baja concentración o ausencia de espermatozoides) (Katz et al., 2017; Turner et al., 2020). Dichos parámetros son de vital importancia ya que el objetivo del espermatozoide es viajar hasta el ovocito para lograr la fecundación, por lo que si estos parámetros se encuentran alterados, este objetivo podría no cumplirse.

Una de las pruebas clásicas que se emplean para la medición de los parámetros espermáticos cuando una pareja sospecha de infertilidad es el espermiograma (Turner et al., 2020). Sin embargo, esta prueba presenta una gran limitante ya que es incapaz de predecir qué tan hábiles son los espermatozoides para viajar a lo largo del tracto genital femenino (TGF) para alcanzar el ovocito. Por ello, es necesario emplear pruebas funcionales que permitan conocer el potencial de los espermatozoides para llevar a cabo la fecundación.

Fisiológicamente, el espermatozoide debe de llevar a cabo los procesos de capacitación y reacción acrosomal (RA) para ser capaz de fecundar al ovocito (Espinosa et al., 2018). Dichos procesos ocurren en el TGF; la capacitación involucra la remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide aumentando su fluidez y permeabilidad, incrementos intracelulares de pH y de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y un cambio en el batido flagelar (hiperactivación) (Espinosa et al., 2018; Ikawa et al., 2010). Una vez concluida la capacitación, los espermatozoides llevan a cabo la RA; un proceso excitotico en donde se fusionan las membranas acrosomal y plasmática del espermatozoide liberando enzimas que le permitirán atravesar las capas externas del óvulo (Jin & Yang, 2016). Tanto en la capacitación como en la RA, participa un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  específico del espermatozoide llamado CatSper (Tamburrino et al., 2014). Se han descrito diversos activadores/agonistas fisiológicos de CatSper dentro de los cuales

se encuentran las hormonas esteroideas como la progesterona (Pg) (Brenker et al., 2018; Lishko & Mannowetz, 2018; Mannowetz et al., 2017; Sun et al., 2019). Sin embargo, existen escasos estudios y mucha controversia sobre el efecto que ejercen otras hormonas esteroideas presentes en los tractos reproductivos femeninos y masculinos sobre CatSper. En 2017, se reportó que la testosterona (T) y la hidrocortisona (HC) por sí solas no activan a CatSper si no que, en concentraciones fisiológicas de plasma sanguíneo (1  $\mu$ M), éstas inhiben la activación de CatSper por Pg, lo que hace pensar que altas concentraciones de estas hormonas en el tracto genital masculino previenen la activación CatSper funcionando como un factor anti capacitante hasta ser removido en el TGF permitiendo la activación del canal (Mannowetz et al., 2017). Sin embargo, por otra parte, otros grupos de investigación han reportado que estas hormonas tienen un efecto agonista sobre CatSper (Brenker et al., 2018; Rehfeld, 2020). Cabe destacar que estos estudios se realizaron mediante técnicas de electrofisiología y mediciones fluorométricas de  $Ca^{2+}$ .

Por ello, el objetivo de este proyecto es analizar los efectos de diferentes concentraciones de estas hormonas en el espermatozoide de humano empleando pruebas funcionales como la RA con la finalidad de conocer si la T e HC tienen efectos similares o distintos en comparación con la Pg y poder aportar más información sobre procesos que deben ocurrir para que un espermatozide sea capaz de fecundar.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Infertilidad**

La infertilidad ha sido reconocida como un problema de salud pública (Lotti & Maggi, 2018) al ser una condición del sistema reproductivo caracterizada por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares (cada 2 o 3 días) sin protección (Zegers et al., 2009). Mundialmente, se estima que alrededor del 15% de las parejas presentan problemas de infertilidad (Barati et al., 2020; Sun et al., 2019). En México, según la Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción existen entre 4 y 5 millones de parejas que tienen dificultad para concebir (AMMR, 2020).

Aproximadamente el 30% de los casos de infertilidad son debidos a factores masculinos, 30% a factores femeninos, 30% a factores no identificados (infertilidad idiopática) y un 10% factores mixtos (femeninos y masculinos) (Katz et al., 2017; Turner et al., 2020).

Además, es importante resaltar que los análisis de semen que se realizan de manera rutinaria, no proveen toda la información necesaria para determinar las causas de la infertilidad; es decir, un hombre puede presentar parámetros de calidad óptimos según la OMS y aún así no lograr un embarazo con su pareja (Turner et al., 2020). Por lo tanto, para entender las causas idiopáticas de la infertilidad, se requieren más estudios acerca de la fisiología del espermatozoide.

#### **2.1.2 Métodos diagnósticos**

Para que se pueda establecer un diagnóstico de infertilidad, la pareja debe someterse a diversas pruebas. Lo primero que se realiza es una historia clínica completa de cada miembro de la pareja en donde se incluyen datos importantes como edad y tiempo que han intentado lograr el embarazo (CIE-10, 2013).

Dentro de los estudios que se realizan a la mujer se encuentran los siguientes:

- Verificación de la ovulación: En mujeres con ciclos irregulares, se realizan determinaciones de interés clínico como: Hormona folículo estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Pg, Hormona estimulante de la tiroides

(TSH), prolactina (PRL) y andrógenos con el objetivo de identificar la localización de la patología:

- TSH y PRL: patología hipofisiaria.
- FSH y LH: Hipo o hipergonadotropos y síndrome de ovario poliquístico.
- 17-OH progesterona: Sospecha de posible hiperplasia suprarrenal.
- Exámenes para la evaluación del útero y las trompas de Falopio.
- Exploración ginecológica completa.

Dentro de los estudios que se realizan al hombre se encuentran:

- Ecosonografía o ultrasonografía Doppler escrotal: Sospecha de varicocele, examinación del parénquima testicular y epidídimo.
- Análisis del semen: Sospecha de posible estado disfuncional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y sobre patologías del sistema genital.

En cuanto al factor masculino, dado que es importante evaluar los parámetros de calidad de los espermatozoides, a continuación se definirán las características de dicha célula.

## **2.2 Espermatozoide**

El término espermatozoide es derivado del griego “semilla” que se refiere a las células reproductoras masculinas.

El espermatozoide es una célula pequeña (50-60 micras), haploide, altamente diferenciada capaz de alcanzar, reconocer y fusionarse con el óvulo a pesar de ser incapaz de llevar a cabo procesos como la transcripción génica o síntesis de proteínas (Darszon et al., 2011). Además, es una célula incapaz de dividirse y presenta una vida útil limitada. Su duración depende del período ovulatorio de la mujer ya que existen variaciones en el pH. Fuera del período ovulatorio (pH vaginal <6), el espermatozoide tiene una vida limitada de 20 a 30 minutos y dentro del período (pH=7-7.5), la célula espermática puede llegar a vivir desde 2 hasta 16 horas (Ruiz, 2016).

### 2.2.1 Anatomía del espermatozoide

En 1677, el científico Anton Van Leeuwenhoek fue el primero en describir la célula espermática (Reproducción Asistida ORG, 2019).

Dado que existen estructuras del espermatozoide que predominan a lo largo de casi toda la célula, serán las primeras en describirse a continuación (**Fig. 1**):

El axonema es una estructura conformada por nueve pares de microtúbulos que rodean a un par central (Romarowski, 2017) en estructura 9x2. La dineína es la proteína motora principal que compone al axonema; sin embargo también existen moléculas chaperonas, proteínas fijadoras de  $Ca^{2+}$  y proteínas cinasas/fosfatasas (Olivera et al., 2006). Desde el cuello hasta la pieza principal del espermatozoide, el axonema se encuentra rodeada por las fibras densas externas y a nivel de la pieza final, únicamente prevalece el axonema.

El metabolismo energético creado a partir de la glucosa es requerido para la activación del axonema; produce y regenera el ATP e intermediarios como el NADPH los cuales son necesarios para que se puedan llevar a cabo las vías de señalización internas que propician a la fosforilación de proteínas que producen el movimiento (Olivera et al., 2006).

Las fibras densas externas se encuentran rodeadas por las mitocondrias en la pieza media y rodeadas por la vaina fibrosa en la pieza principal (Darszon et al., 2011) las cuales contribuyen al movimiento del flagelo.

En la cabeza del espermatozoide (la cual mide de 5-8 micras) se encuentra localizado el acrosoma que es una estructura membranosa derivada del aparato de Golgi que tiene la forma de un capuchón. Se encuentra justo debajo de la membrana plasmática del espermatozoide y contiene enzimas hidrolíticas (acrosina y hialuronidasa, principalmente) para fusionarse con el óvulo. Su formación comienza al inicio de las etapas de desarrollo de la espermátida (célula germinal masculino a partir de la cual se origina el espermatozoide). El tamaño del acrosoma va aumentando gracias a la fusión continua de vesículas derivadas del aparato de Golgi las cuales van extendiéndose sobre el polo nuclear anterior. El acrosoma se encuentra estrechamente asociado con la envoltura nuclear redundante (Han et al., 2017).

El acrosoma comprende una estructura de capuchón anterior (sometida a la reacción acrosomal) y un segmento ecuatorial posterior que no participa en dicha reacción. De hecho, el segmento debe permanecer intacto una vez que la reacción acrosomal se ha llevado a cabo ya que es el sitio en donde se inicia la fusión de los gametos durante la fertilización (Mortimer, 2018).

El núcleo del espermatozoide ocupa el mayor espacio de la cabeza ya que estas células presentan muy poco citosol. Es un núcleo muy denso dado que contiene fibras de cromatina altamente condensadas. Las histonas que se unen al ADN son sustituidas en su mayoría por protaminas las cuales forman enlaces disulfuro para proporcionarle estabilidad y un alto grado de protección al ADN contra cualquier daño (Chemes, 2017; Darszon et al., 2011; Mortimer, 2018).

El flagelo del espermatozoide se puede dividir en tres piezas (**Figura 1**):

1. Pieza media: Es la primera porción en donde se distingue principalmente el cuello (6-12 micras) del espermatozoide dentro de los cuales se encuentran las siguientes estructuras:

La envoltura nuclear redundante se encuentra en los espermatozoides de humano en la región posterior de la cabeza que tiene aspecto de una cortina doblada que cuelga desde la parte posterior del núcleo. Se ha sugerido que la presencia de poros en esta envoltura juega un papel muy importante en las últimas etapas de maduración de los espermatozoides o incluso durante la fertilización (Mortimer, 2018). De igual manera, es importante mencionar que esta envoltura persiste luego de la condensación nuclear en la espermatogénesis (Torres Fuentes, 2015). Además, se reconoce como un reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  que es vital para la hiperactivación de los espermatozoides (Mortimer, 2018; Olson et al., 2011).

El centriolo se encuentra a nivel del cuello (base de la cabeza) del espermatozoide y es la única estructura celular que es aportada por el padre. Es el origen de los centriolos de todas las células que componen el organismo. Tiene una estructura cilíndrica formada por microtúbulos los cuales se encargan del ensamblaje de los mismos participando en diversos procesos como la organización celular, formación y función de flagelos y cilios y en la división celular (mitosis y meiosis) (Avidor-Reiss et al., 2019).

Hasta hace algunos años se pensaba que los espermatozoides únicamente proporcionaban un solo centriolo al óvulo y que después se duplicaban. Sin embargo, en una investigación realizada en el 2019, se reportó que el padre dona dos centriolos durante la fertilización ya que un óvulo fertilizado requiere de ambos para la formación de un nuevo individuo. De hecho, Avidor y col. encontraron que uno de los centriolos que se encuentran en el espermatozoide es “atípico” ya que es muy diferente en su estructura y composición de proteínas. Sin embargo, este centriolo contiene las proteínas necesarias para formar un centriolo completamente funcional después de la fertilización (Avidor-Reiss et al., 2019).

En cuanto a la gota citoplasmática, ésta es el pequeño residuo citoplasmático que queda después de la espermiogénesis (Cooper, 2011).

En el cuello también se encuentran localizadas las mitocondrias las cuales le proporcionan energía al espermatozoide para el viaje que éste realizará a través del TGF. Dicha energía proporcionada en forma de ATP, proviene del metabolismo de la glucosa el cual es requerido para la activación del axonema. El ingreso de la glucosa al citosol se da gracias a transportadores GLUT3 en la pieza media. La glucosa se transforma en glucosa-6-fosfato para generar ATP e intermediarios (NADPH) por vía de las pentosas fosfato o fosforilación oxidativa (Olivera et al., 2006).

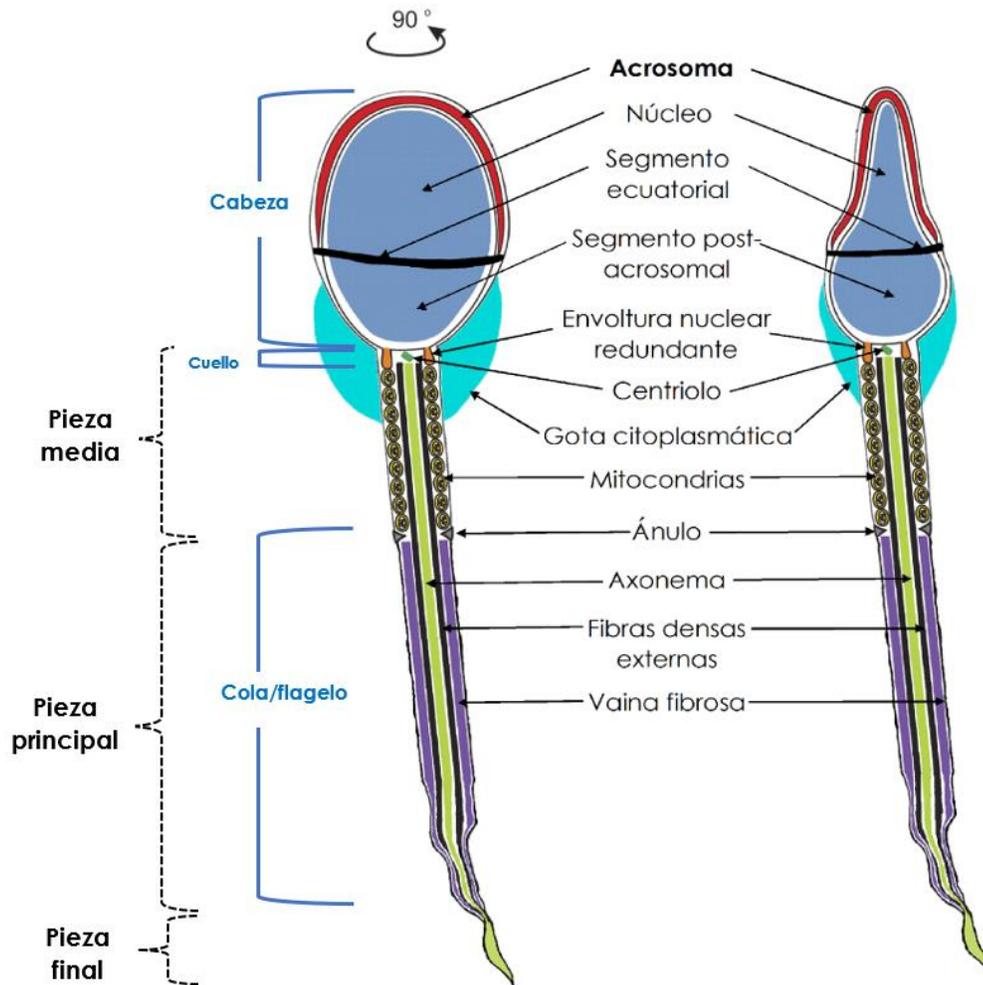
2. Pieza principal: Es el segmento más largo del flagelo (50 micras) y se encuentra íntimamente relacionada con el batido flagelar (Zhu, 2020). El espermatozoide presente una velocidad de nado de 3 milímetros por minuto, aproximadamente (Reproducción Asistida ORG, 2019).

Dentro de la pieza principal, se pueden distinguir dos estructuras:

Ánulo: Es la estructura interna que divide a la pieza media y a la pieza principal.

Vaina fibrosa: Es una estructura del citoesqueleto que se encuentra rodeando al axonema y a las fibras densas externas. Se trata de dos columnas longitudinales que se ensamblan a lo largo de la espermiogénesis. La vaina fibrosa influye en el grado de flexibilidad, el movimiento flagelar y la forma del batido flagelar de los espermatozoides (Eddy et al., 2003).

3. Pieza final: Es la última parte de la cola o flagelo del espermatozoide en donde la única estructura que permanece es el axonema (Darszon et al., 2011).



**Figura 1: Anatomía del espermatozoide humano.** El espermatozoide se divide en pieza media, principal y final. Dentro de la pieza media se encuentran la envoltura nuclear redundante, centriolo, gota citoplasmática y mitocondrias. La pieza media y principal se encuentran separadas por el ánulo. En la pieza principal, se encuentra la vaina fibrosa (morado) que rodea a las fibras densas externas (negro) y al axonema (verde) desde la pieza media. En la pieza final, únicamente predomina la estructura del axonema. Tomada y adaptada de Darszon et al., 2011.

### 2.2.2 Espermatogénesis

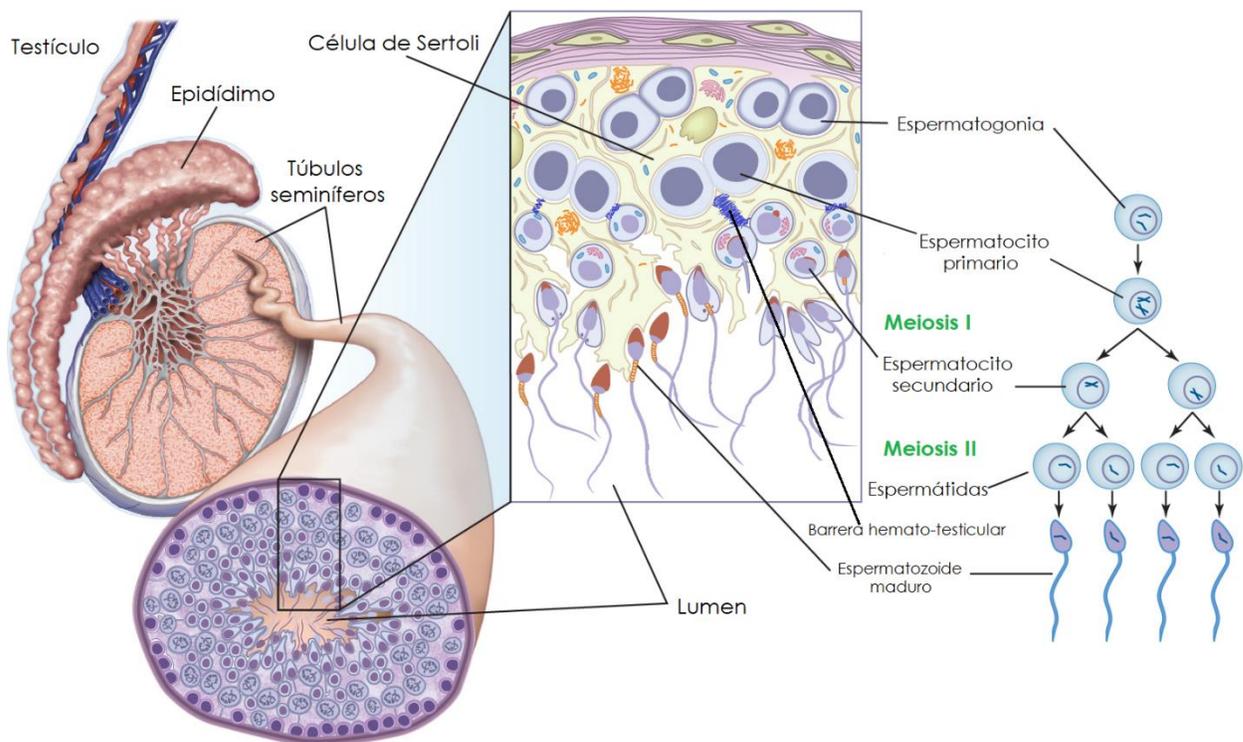
El origen, desarrollo y producción de espermatozoides se lleva a cabo por un proceso denominado espermatogénesis (Reproducción Asistida ORG, 2018) el cual ocurre de manera continua en los hombres adultos cuya duración es de 64-72 días (Darszon et al., 2011). Este proceso se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos de los testículos en donde se distinguen tres generaciones diferentes de células germinales: espermatogonia, espermatoцитos y espermátidas (**Figura 2**) (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014).

Durante el proceso de espermatogénesis, las células germinales (espermatogonia) experimentan cambios esenciales tanto estructural como funcionalmente los cuales se encuentran regulados por las células de Sertoli (Darszon et al., 2011).

Los espermatoцитos primarios se diferencian de la espermatogonia atravesando la barrera hemato-testicular la cual se encuentra formado por uniones estrechas de las células de Sertoli. Posterior a ello, se forman los espermatoцитos secundarios a través de la primer meiosis los cuales luego se convierten a espermátidas gracias a la segunda meiosis (Darszon et al., 2011).

Luego, las espermátidas se deberán convertir a espermatozoides; este proceso se conoce como espermiogénesis la cual es la etapa final de la espermatogénesis. Este proceso conlleva diversos cambios como la elongación de la célula, condensación del núcleo, formación del acrosoma y remoción del citoplasma casi por completo (realizado por las células de Sertoli) para formar un espermatozoide completamente desarrollado. Este citoplasma residual se conoce también como gota citoplasmática (Darszon et al., 2011).

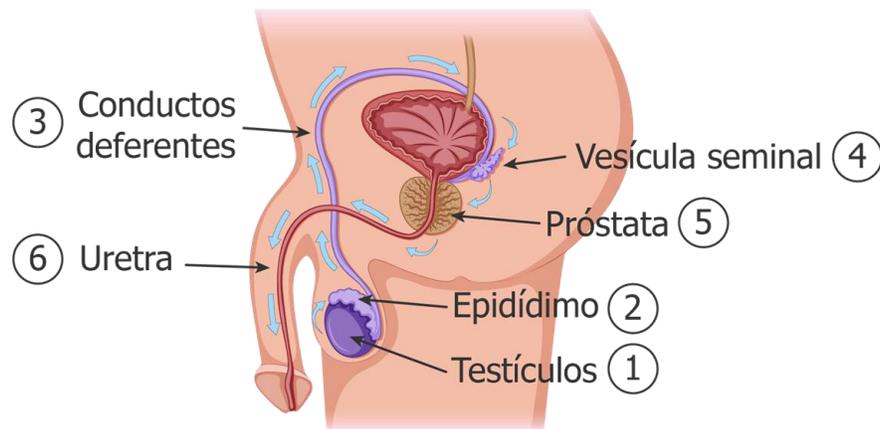
Posteriormente, los espermatozoides recién formados son transportados y almacenados en el epidídimo a través del lumen del tubo seminífero en donde completarán su proceso de maduración necesario para adquirir motilidad. Finalmente, la última etapa de maduración tiene lugar en el TGF en donde ocurre la capacitación que termina con la RA (Darszon et al., 2011).



**Figura 2: Síntesis del espermatozoide.** El proceso de espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos localizados dentro del testículo. Se aprecian 3 generaciones diferentes de células: espermatogonia, espermatocito y espermatidas. Tomada y adaptada de Encyclopedia Britannica, 2019.

### 2.2.3 Transporte del espermatozoide

Una vez que los espermatozoides han sido producidos en los testículos y madurado en el epidídimo, estos son transportados hacia los conductos eyaculadores de la próstata por los conductos deferentes. Luego, en la uretra se combinan los espermatozoides con algunas secreciones de la próstata. En este punto, también participan las glándulas bulbouretrales los cuales contribuyen a la formación del líquido seminal para que finalmente, esta mezcla (semen) sea expulsada del cuerpo a través de la uretra (Roberts, 2010) **(Figura. 3)**.



**Figura 3: Transporte del espermatozoide.** El espermatozoide sigue una ruta para transportarse: túbulos seminíferos (testículo), maduración en el epidídimo, transporte hacia los conductos deferentes para posteriormente pasar por la vesícula seminal y la próstata donde se enriquece el líquido seminal. Finalmente, los espermatozoides llegan a la uretra para ser expulsados. Tomada de Reproducción Asistida, ORG, 2017.

### 2.2.3.1 Semen

El semen es un líquido viscoso que se expulsa durante la eyaculación. En el semen se encuentran contenidos los espermatozoides, secreciones líquidas de los órganos sexuales accesorios como ácido cítrico, aminoácidos libres, fructosa, enzimas, prostaglandinas y algunos iones como potasio y zinc (Ananya Mandal, 2019).

Algunas funciones del semen son las siguientes:

- Sirve como medio de nutrición y transporte para los espermatozoides
- Brinda un pH controlado para que los espermatozoides puedan ser depositados en la vagina.
- Retiene a los espermatozoides dentro de la vagina por un período de tiempo suficiente para que ocurra la activación espermática (capacitación).

En la **Tabla 1** se presentan los porcentajes en los que contribuyen los diferentes órganos del aparato reproductor masculino para la formación del líquido seminal.

**Tabla 1: Composición del semen.** El semen se forma gracias a la contribución de diversos productos de los distintos órganos del aparato reproductor masculino. Las vesículas seminales son aquellas que tienen un mayor aporte de productos, seguido de la glándula prostática y finalmente los testículos, epidídimo y la glándula bulbouretral.

COMPOSICIÓN DEL SEMEN		
Porcentaje	Órgano productor	Productos
46-80%	Vesículas seminales	Factores pro-coagulantes, fructosa
13-33%	Glándula prostática	Enzimas proteolíticas (seminina, enzima de estructura similar a la quimiotripsina, uroquinasa)
5%	Testículos y epidídimo	Espermatozoides
2-5%	Glándula bulbouretral	Líquido transparente y resbaladizo

### 2.2.3.1.1 Análisis del semen

Una manera de analizar el semen es a través del examen de laboratorio llamado espermiograma. Es un examen diagnóstico muy fácil de realizar cuando se inicia el estudio de la fertilidad masculina. Dentro de este examen, se evalúan algunos aspectos del semen tanto físicos (volumen, pH, viscosidad y color) como aspectos celulares (número de espermatozoides, movilidad, vitalidad y morfología) (Vásquez, 2007). En la **Tabla 2** se muestran los valores normales de los parámetros evaluados en el espermiograma según la OMS (Katz et al., 2017).

Para lograr un resultado fiable del espermiograma, la recolección de la muestra debe ser adecuada por lo que se recomienda lo siguiente:

- El paciente deberá presentar de 2 a 3 días de abstinencia.  
Esto es de vital importancia ya que períodos más cortos pueden afectar de manera negativa el conteo de los espermatozoides y en períodos mayores se puede ver afectada la motilidad de los mismos.
- La muestra debe depositarse directamente en un frasco estéril.  
En caso de que se recolecte en el hogar, la muestra deberá permanecer a una temperatura corporal hasta que se transporte al laboratorio.
- La muestra debe analizarse dentro de un período máximo de 1 hora.

**Tabla 2: Parámetros normales del semen.** Dentro del espermiograma, se evalúan diversos parámetros como el volumen, pH, concentraciones de espermatozoides, tipo de motilidad, vitalidad, morfología y leucocitos.

<b>PARÁMETROS EVALUADOS EN EL ESPERMIOGRAMA DE ACUERDO CON EL MANUAL DE LA OMS</b>	
Volumen	≥ 1.5 ml
pH	≥ 7.2
Concentración de espermatozoides	≥ 15 millones/ml
Conteo de espermatozoides totales	≥ 39 millones
Motilidad total	≥ 40%
Motilidad progresiva	≥ 32%
Vitalidad	≥ 58%
Morfología normal	≥ 4%
Leucocitos	< 1.0 x 10 <sup>6</sup> /ml

Si dichos parámetros se encuentran dentro de los valores esperados, una prueba será suficiente. Sin embargo, en aquellos pacientes en donde el análisis muestre valores anormales, se recomienda repetir el análisis después de 1 a 3 meses para aquellos que presenten algún trastorno leve o moderado y de 2 a 4 semanas para los que presenten oligospermia severa (bajo número de espermatozoides en el semen) o azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen) (Katz et al., 2017).

El espermiograma es uno de los más importantes en la evaluación del paciente masculino, sin embargo como se mencionó anteriormente, éste no determina de manera definitiva qué tan fértil es el paciente. Existen hombres con resultados anormales en este análisis que son capaces de concebir y de manera contraria, hombres con resultados normales que son incapaces de lograr un embarazo (Katz et al., 2017). Cabe resaltar que el espermiograma es una prueba subjetiva ya que se realiza de forma manual por un analista y esto conlleva a variabilidad en los resultados (Vallvè, 2017).

Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides contenidos en el semen deben experimentar una última fase de maduración que ocurre en el TGF en donde ocurre el proceso de capacitación que se explicará a continuación:

### 2.3 Capacitación espermática

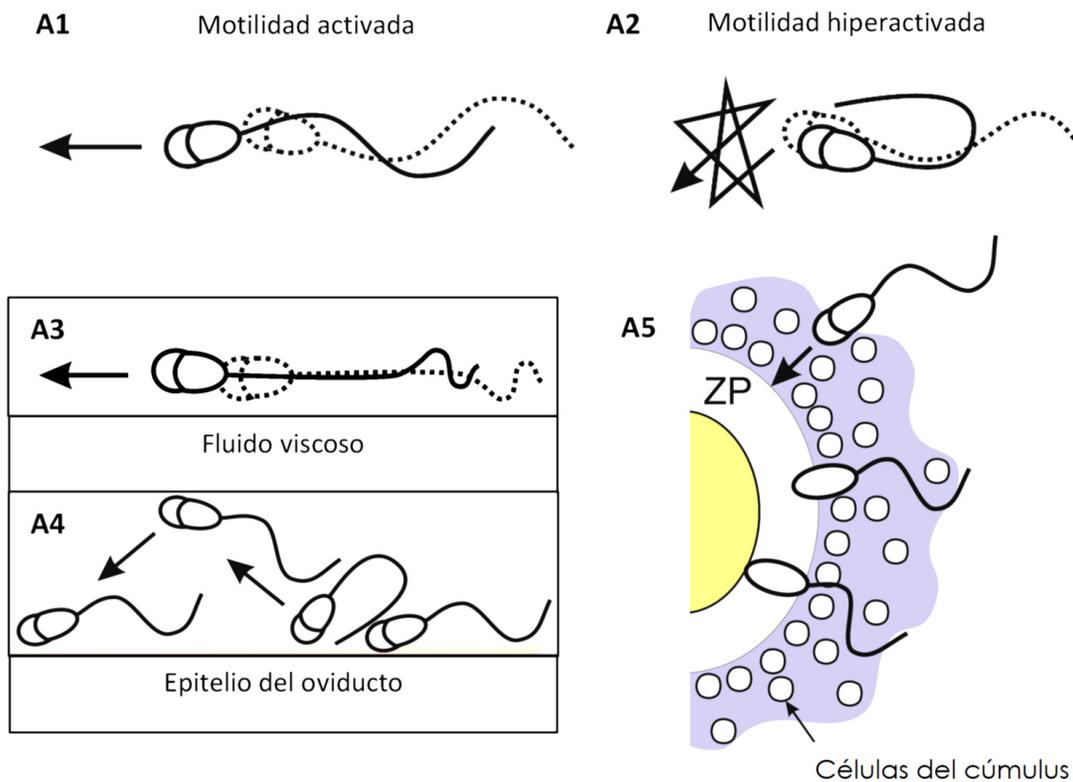
La capacitación espermática se define como el proceso por el que atraviesa el espermatozoide después de la eyaculación que le confiere la capacidad para fecundar al óvulo. Este proceso conlleva diversas modificaciones en su estructura y movilidad que son las que le permitirán al espermatozoide atravesar las capas externas que recubren al óvulo para fusionarse con él y dar lugar al embrión (Rodrigo et al., 2019).

Estas modificaciones incluyen (Espinosa et al., 2018):

1. Pérdida de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide: Durante la capacitación, la membrana citoplasmática del espermatozoide experimenta una reorganización, particularmente la remoción de colesterol, funcionalmente origina regiones heterogéneas como lo es el área que recubre el límite del acrosoma para que se pueda llevar a cabo la reacción acrosomal (Mortimer, 2018).
2. Aumento de proteínas fosforiladas: Durante la capacitación hay un incremento en la concentración de AMPc el cual es sintetizado a partir de la adenilato ciclasa soluble (ACs). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) la cual fosforilará residuos de tirosina en las fibras densas externas y en la vaina fibrosa del flagelo (Mortimer, 2018).
3. Cambio en el batido flagelar: Al inicio, el batido flagelar es simétrico con una baja amplitud y una alta frecuencia; esto resulta en un nado progresivo en un medio no viscoso (batido flagelar activado). Por el contrario, cuando el espermatozoide se encuentra en la ámpula del oviducto (donde ocurre la fecundación), su nado cambia a un batido flagelar asimétrico, con una alta amplitud y una baja frecuencia (batido flagelar hiperactivado) (**Figura 4**). Aquellos espermatozoides que hayan pasado por el proceso de capacitación y de hiperactivación flagelar podrán despegarse del epitelio oviductal y de

esta manera ayudar al único espermatozoide fecundador a atravesar las capas más externas del óvulo (Mortimer, 2018).

4. Aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular: La hiperactivación del espermatozoide además de depender de la flexibilidad flagelar, también depende del incremento del  $[Ca^{2+}]_i$ . Este  $[Ca^{2+}]_i$  se origina de reservorios que existen en el espermatozoide localizados a nivel de la cabeza: acrosoma y envoltura nuclear redundante (Mortimer, 2018).



**Figura 4: Cambios en el batido flagelar del espermatozoide.** En medio no viscoso, se aprecia un espermatozoide con una motilidad activada **A1** y en **A2** uno con batido flagelar asimétrico de gran amplitud que no le permite avanzar. Sin embargo, en medio viscoso **A3** (como el del tracto reproductor femenino), un espermatozoide con motilidad hiperactivada puede avanzar de forma progresiva. Esta hiperactivación, permite que los espermatozoides se pueden separar del oviducto **A4** y avanzar hacia la ampulla (sitio de fertilización) para que se pueda llevar a cabo la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida (ZP) y las células del cúmulo **(A5)**. Tomada y adaptada de Darszon, 2011.

5. Aumento de pH intracelular: Durante el recorrido por el TGF, el espermatozoide es expuesto a un pH alcalino el cual se caracteriza por mayores concentraciones de  $HCO_3^-$  el cual ocurre gracias al co-transportador  $Na^{2+}/HCO_3^-$ . Dicho aumento de pH es importante ya que el canal de  $Ca^{2+}$

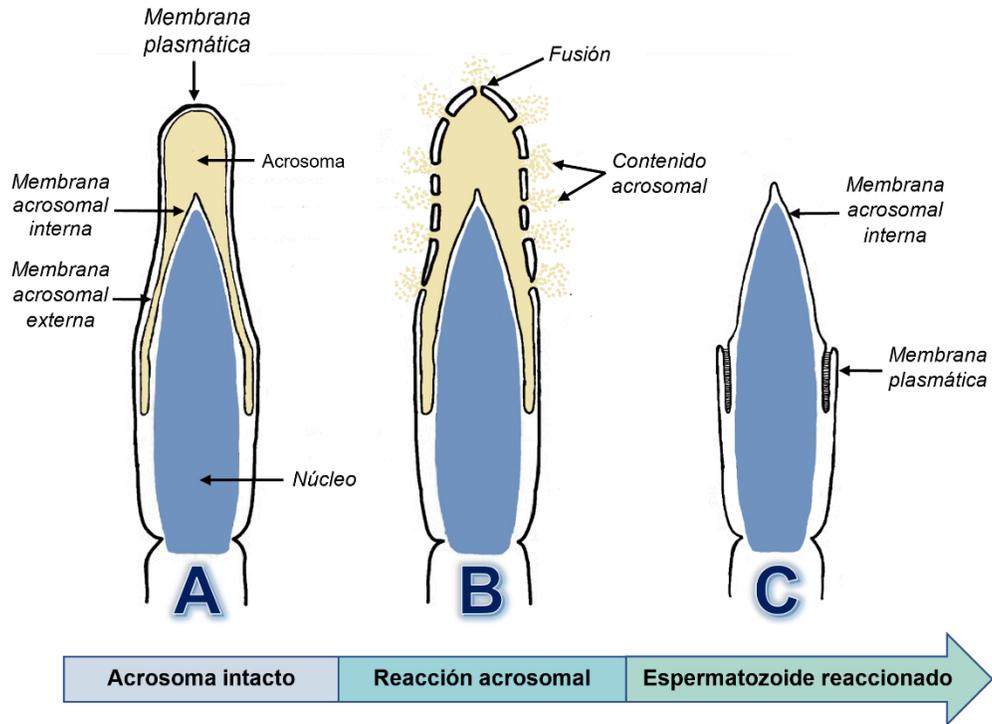
CatSper, se activa en medio alcalino (Puga Molina et al., 2018). Se ha sugerido que este incremento en el pH está regulado por el canal de protones voltaje dependiente (Hv) y por intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  expresados en el espermatozoide (sNHE) (**Figura 9**). Estos canales son voltaje dependientes; es decir, se activan gracias a cambios en el potencial de la membrana plasmática (Singh & Rajender, 2015).

6. Hiperpolarización de la membrana plasmática: Existen dos mecanismos principales para que esta hiperpolarización ocurra; disminución de la actividad de los canales de  $\text{Na}^+$  y la activación de los canales selectivos de  $\text{K}^+$  en donde participa el canal SLO (Ritagliati et al., 2018). En algunos estudios se ha reportado que los espermatozoides no capacitados tienen un potencial de membrana ( $E_m$ ) alrededor de -35 a -45 mV y aquellos capacitados hasta -80 mV. De acuerdo con investigaciones previas, la hiperpolarización se correlaciona con el incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y de pHi. (López-González et al., 2014).

Una vez completado el proceso de capacitación, los espermatozoides se encuentran listos para llevar a cabo la reacción acrosomal (Zeginiadou et al., 2000).

## 2.4 Reacción acrosomal

La RA es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en donde se lleva a cabo el proceso de exocitosis del acrosoma del espermatozoide necesario para la fertilización del óvulo (Georgadaki et al., 2016). Este proceso implica la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa en la región anterior de la cabeza del espermatozoide (Mata-Martínez et al., 2018) (**Figura 5**).



**Figura 5: Reacción acrosomal del espermatozoide.** Se muestra la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal que dan lugar a un acrosoma reaccionado. Tomada y adaptada de Wasarman, 1999 y Mata, 2018.

Hace un par de años, se creía que las glucoproteínas de la zona pelúcida eran aquellas moléculas agonistas que desencadenaban una fertilización exitosa ya que se pensaba que la RA ocurría cuando el espermatozoide se encontraba con estas glicoproteínas (Gadella, 2010). Sin embargo, estudios recientes realizados en espermatozoides de ratones, reportaron que la exocitosis acrosomal no sucede cerca de la zona pelúcida si no que una proporción significativa de esta exocitosis ocurre en los segmentos superiores del istmo oviductal (La Spina et al., 2016).

Estos resultados permiten hipotetizar que la zona pelúcida podría no ser el principal inductor de la RA *in vivo*, lo que refuerza la hipótesis de que la Pg podría ser la molécula principal que desencadene la reacción acrosomal (Patrat et al., 2000) ya que ésta es secretada por las células de la granulosa ovárica y de la masa del cúmulo que rodea al ovario así como también es un factor importante del líquido oviductal (Sumigama et al., 2015).

En un estudio realizado por Simons y colaboradores en el 2018, mediante un modelo matemático, ellos proponen que la reacción acrosomal depende de diversos

mecanismos reductantes que propician a que exista un alto nivel de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual se requiere para que se lleve a cabo una reacción acrosomal exitosa y por ende la fertilización del ovocito (Simons & Fauci, 2018).

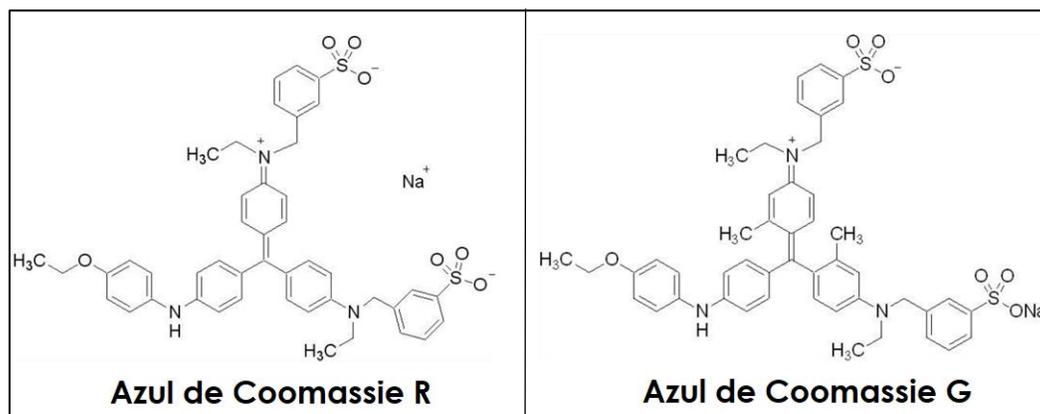
#### 2.4.2 Evaluación de la reacción acrosomal

Existen diversas técnicas que permiten la evaluación de este evento en la célula espermática; sin embargo, únicamente se mencionarán las dos que se emplearon en este estudio:

##### 2.4.2.1 Tinción con Azul de Coomassie

Es una tinción económica, práctica y efectiva para la evaluación del estado acrosomal de espermatozoides en ganado, cerdo, conejo, ratones y humanos (Brum et al., 2006; Giuliano & Fumuso, 2015; Larson & Miller, 1999).

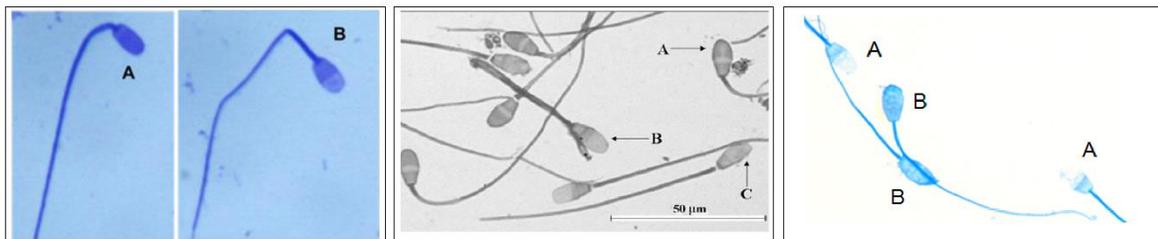
Existen dos tipos de tinción de Azul de Coomassie: R-250 y G-250. Ambas son formas químicas de un compuesto de trifenilmetano disulfonado. La diferencia estructural entre ellas radica en que la forma G-250 tiene dos grupos metilo adicional en los dos anillos centrales inferiores de su estructura comparado con la R-250 como se muestra en la **Figura 6** (Sigma-Aldrich Co., 2018). De acuerdo con especificaciones en hojas técnicas, la tinción G-250 se emplea para determinar proteínas en soluciones (interchim, 2022). Sin embargo, la tinción R-250 también se ha empleado para determinar la RA (Jiang et al., 1998).



**Figura 6: Formas del colorante Azul de Coomassie.** En el panel de la izquierda se muestra la forma R-250 y en el panel de la derecha se muestra la forma G-250 la cual contiene 2 metilos adicionales. Tomada y adaptada de Sigma-Aldrich Co, 2018.

El colorante Azul de Coomassie posee grupos sulfónicos los cuales pueden unirse a proteínas a través de interacciones iónicas entre el grupo sulfónico ácido y el grupo positivo amino de las proteínas así como a través de interacciones de Van de Waals (Bio-Imaging Systems, 2020; Thermo Fisher, Scientific, 2020).

Por lo tanto, la tinción Azul de Coomassie es capaz de teñir los acrosomas intactos en la región anterior de la cabeza del espermatozoide y aquellos que no presenten la reacción acrosomal, exhibirán ausencia de tinción o una tinción muy débil en la región del acrosoma (**Figura 7**) (Brum et al., 2006; Larson & Miller, 1999).



**Figura 7: Evaluación del estado acrosomal con Azul de Coomassie.** En la primera figura se observan espermatozoides de llama. En A se puede apreciar un espermatozoide no reaccionado ya que presenta un color azul intenso en la región del acrosoma. En B se observa una tinción débil que es el resultado de un espermatozoide que sufrió la reacción acrosomal. En la figura de en medio se observan espermatozoides de equino. En A se observa una coloración intensa sobre el acrosoma (espermatozoide no reaccionado) y en B y C se muestran aquellos espermatozoides no teñidos o con una tinción irregular sobre el acrosoma. En la última figura se observan espermatozoides de conejo en donde se pueden distinguir aquellos espermatozoides reaccionados (A) de los no reaccionados (B). Imágenes tomadas de Giuliano & Fumuso, 2015, Brum et al., 2006 y Mayren et al., 2012.

#### 2.4.2.2 Tinción con FITC-PSA

La integridad de la membrana acrosomal puede evaluarse con diversas técnicas de fluorescencia (Celeghini et al., 2010). Una de las más empleadas es el uso de marcadores glicoprotéicos como las lectinas (Celeghini et al., 2010). Las lectinas son glicoproteínas que se unen de manera específica a azúcares ubicados en las estructuras celulares (Cox et al., 1998).

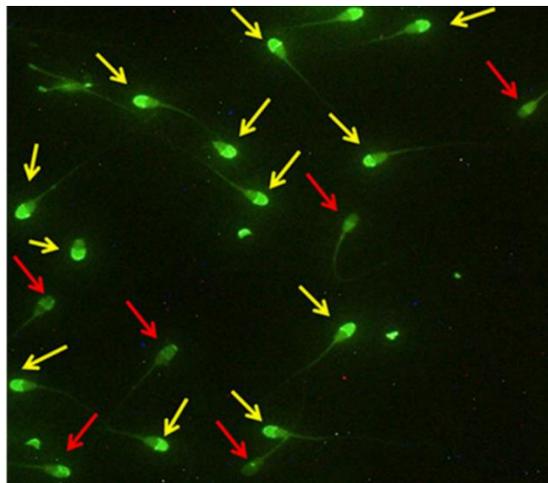
Entre las lectinas, la más comúnmente utilizada es la *aglutinina Pisum sativum* (PSA) la cual es capaz de reconocer los residuos de  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-galactosa y glucosamina de los glicoconjugados localizados en la matriz acrosomal por lo que cuando se conjuga con un fluorocromo (molécula capaz de emitir fluorescencia al ser excitada a cierta longitud de onda) puede identificar espermatozoides con el

acrosoma dañado o ausente (Cardona et al., 2006; Celeghini et al., 2010; Cox et al., 1998).

Uno de los fluorocromos más empleados es el colorante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual es una molécula derivada de la fluoresceína que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno (EMD Millipore Corporation, 2017). FITC se emplea para el marcaje de moléculas o anticuerpos (llamados también conjugados) como inmunoglobulinas, lectinas, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (EMD Millipore Corporation, 2017).

La tinción FITC-PSA es una tinción negativa ya que cuando la aglutinina PSA se une a FITC es capaz de marcar los acrosomas dañados de color verde; es decir, esta tinción permite determinar la desaparición de la membrana plasmática debido a que cuando ocurre la reacción acrosomal, ésta desaparece del dominio acrosomal del espermatozoide (**Figura 8**) (Almeida et al., 2018; Cardona et al., 2006; Celeghini et al., 2010).

Con el fin de querer conocer el estado acrosomal de un espermatozoide, frecuentemente se emplea una tinción nuclear como el yoduro de propidio (PI) que sirve como una tinción espermática de contraste, ya que la combinación de ambas, permiten una evaluación eficaz, rápida y simple de la presencia o ausencia de la membrana acrosomal (Cox et al., 1998).



**Figura 8: Tinción FITC-PSA.** Espermatozoides de cabra teñidos con FITC-PSA en donde una coloración verde en la región acrosómica indica un espermatozoide que está intacto (flechas amarilla) y aquellos que no presentan fluorescencia son espermatozoides no reaccionados (flechas rojas). Tomada de Reddy, 2018.

Retomando lo que se mencionó anteriormente, para que se pueda llevar a cabo la RA, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental. Dicha concentración se encuentra regulada mediante el canal CatSper y sus complejos que se describen a continuación:

## **2.5 Canal de calcio de espermatozoide (CatSper)**

CatSper es un canal catiónico específico del espermatozoide selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$ , débilmente dependiente de voltaje y sensible al pH intracelular alcalino el cual promueve su activación. Controla la entrada de iones cargados positivamente hacia la célula espermática; lo cual es esencial para la capacitación espermática, RA y por ende para la fertilidad masculina (Singh & Rajender, 2015; X. Sun et al., 2017).

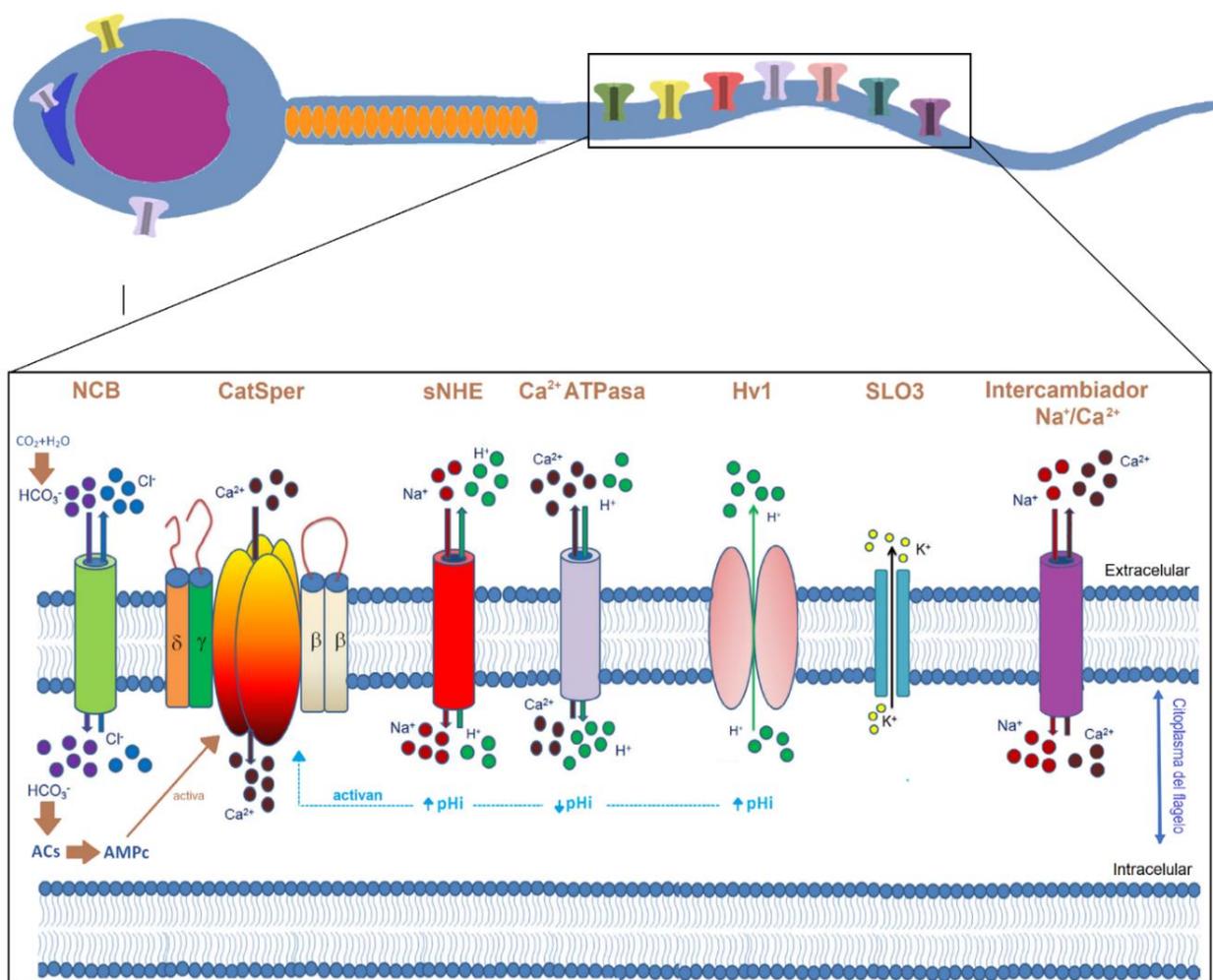
Este canal se encuentra confinado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide. El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  permite un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula espermática lo que produce un movimiento más rápido y vigoroso de la misma. Así mismo, este canal es el único que se ha demostrado que es de vital importancia para la motilidad espermática hiperactivada, el desprendimiento del espermatozoide del epitelio del tracto reproductor femenino, la penetración del ovocito y finalmente la fertilidad (Singh & Rajender, 2015).

### **2.5.1 Estructura y regulación de CatSper**

CatSper es un canal heterotetramérico dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y se encuentra formado por 4 subunidades  $\alpha$  que forman el poro del canal (CatSper 1, 2, 3 y 4) (Singh & Rajender, 2015; Tamburrino et al., 2014). Además contiene 3 subunidades auxiliares (CatSper  $\beta$ , CatSper  $\gamma$  y CatSper  $\delta$ ) (Singh & Rajender, 2015) (**Figura 9**) y muy recientemente se identificaron otras 2 subunidades (CatSper epsilon y CatSper zeta) que co-localizan con el resto el complejo Catsper (Lishko & Mannowetz, 2018a).

Cada una de las 4 subunidades  $\alpha$  tiene 6 segmentos transmembranales en donde se distinguen 2 dominios diferentes: el dominio sensible a voltaje y el dominio de formación de poro. Es de importancia mencionar que 4 de los 6 pases transmembranales de estas subunidades contienen residuos de aminoácidos con carga positiva, principalmente lisina y arginina (Singh & Rajender, 2015).

El hecho de que participen diversas subunidades, hace que el canal sea complejo, sin embargo se requiere de todas ellas para que el espermatozoide lleve a cabo su coordinación funcional la cual se basa en proporcionales a los espermatozoides una motilidad hiperactivada y por lo tanto fertilidad (Tamburrino et al., 2014).



**Figura 9: Funcionamiento y regulación de CatSper.** Existen diversos canales (sNHE, ATPasa y Hv1) que juegan un papel importante en la regulación de CatSper. El NCB importa iones bicarbonato que activan a la adenilato ciclasa soluble el cual desencadena la vía de señalización del AMPc que tendrá como consecuencia la activación de Catsper. Todos estos canales esquematizados se encuentran en la pieza principal del espermatozoide. Algunos de ellos se han localizado en otras partes del espermatozoide; la calcio ATPasa y Catsper también se encuentra a nivel del acrosoma y de la membrana plasmática. NCB: Intercambiador dependiente de Na<sup>+</sup> (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), CatSper: Canal de calcio del espermatozoide, sNHE: intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Hv1: canal de hidrógeno dependiente de voltaje, SLO3: canal de K<sup>+</sup> específico de espermatozoide, pH: potencial de hidrógeno, ACs: adenilato ciclasa soluble, AMPc: adenosín monofosfato cíclico. Tomada y adaptada de Singh & Rajender, 2015 y Sun et al., 2017.

Este canal además de permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al espermatozoide, también permite el paso de cationes monovalentes (como el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cs}^+$ ) o cationes divalentes (como el  $\text{Ba}^{2+}$ ) en ausencia de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Singh & Rajender, 2015; X. Sun et al., 2017) lo cual es muy raro que ocurra ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  siempre se encuentra presente de manera fisiológica.

Además de CatSper, existen otros canales y bombas de iones como el intercambiador dependiente de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) (NCB), el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (sNHE), la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , el canal 1 de  $\text{H}^+$  dependiente de voltaje (Hv1), el canal de  $\text{K}^+$  específico de espermatozoide (SLO3) y el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  los cuales se han propuesto trabajar en conjunto con CatSper (Singh & Rajender, 2015).

### **NCB**

En el espermatozoide, el pH alcalino se logra mediante la actividad del intercambiador dependiente de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ), (NCB por sus siglas en inglés *Na<sup>+</sup>-dependent (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) exchanger*) el cual contribuye a la acumulación de iones bicarbonato para estimular a la adenilato ciclasa la cual ejerce un papel importante en el incremento del adelinato monofosfato cíclico (AMPC) (Lishko & Kirichok, 2010).

### **sNHE**

El intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (sNHE) (por sus siglas en inglés *Sperm Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*) actúa a través de la adenilato ciclasa soluble (ACs) que se encarga igualmente de generar AMPC en respuesta a estímulos fisiológicos como el bicarbonato. La elevación del AMPC dependiente de ACs, facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de CatSper a través de la fosforilación dependiente de la proteína quinasa A (PKA). De hecho, en estudios previos con murinos se ha reportado que cuando existe ausencia o deficiencia de la ACs, existe un fenotipo estéril (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006).

En los espermatozoides, la actividad se ve suprimida cuando existe alta concentración de iones hidrógeno y baja concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular. De modo que, para que un espermatozoide se active, se requiere lo

inverso; una elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  y una reducción de  $[H^+]_i$ , lo cual se media gracias a las bombas de  $Ca^{2+}$  e hidrógeno, respectivamente.

En el fagelo del espermatozoide se pueden diferenciar tres tipos de bombas de  $Ca^{2+}$  que permiten su regulación:

- La bomba  **$Ca^{2+}$  ATPasa** la cual se conoce por poseer efectos antagonistas en la motilidad y en la capacidad de fertilización del espermatozoide ya que se encuentra regulada por el  $Ca^{2+}$  y por  $H^+$  y permite la exportación del  $Ca^{2+}$  fuera de la célula espermática.
- El intercambiador  **$Na^+/Ca^{2+}$**  el cual exporta 1 ion de  $Ca^{2+}$  por cada 3 iones importados de  $Na^+$ . Este intercambiador es muy eficiente en ambos sentidos ya que es uno de los encargados en regular la homeostasis del  $Ca^{2+}$ .
- El canal **CatSper** el cual se describió anteriormente que permite el ingreso de  $Ca^{2+}$  dentro del espermatozoide.

La regulación del pH intracelular del espermatozoide se encuentra controlado por el canal de hidrógeno dependiente de voltaje (**Hv1**) (por sus siglas en inglés *voltage-gated  $H^+$  channel 1*) el cual se encuentra localizado en la pieza principal del espermatozoide humano. Este canal se considera como el responsable de la alcalinización intracelular lo cual involucra la expulsión de iones  $H^+$  del espermatozoide (Lishko & Kirichok, 2010; Singh & Rajender, 2015).

La alcalinización intracelular en los espermatozoides tiene como finalidad la activación de Catsper para que exista la entrada de  $Ca^{2+}$  en el flagelo del espermatozoide lo cual causa una hiperactivación y preparación para llevar a cabo la reacción acrosomal (Lishko & Kirichok, 2010).

### SLO3

El canal de  $K^+$  específico de espermatozoide (SLO3) (por sus siglas en inglés *sperm specific  $K^+$  channel*), es un canal localizado en la pieza principal del flagelo del espermatozoide. Es sensible al pH que se encuentra formado por 3 hélices transmembranales que se encarga del proceso de hiperpolarización durante la capacitación que de igual manera, esta hiperpolarización, facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  mediante CatSper (Singh & Rajender, 2015).

### 2.5.2 Expresión y localización de los genes que codifican para CatSper

El complejo del canal CatSper se encuentra codificado por al menos siete genes (**Tabla 3**). CatSper 1-3 son expresados exclusivamente en testículos mientras que CatSper 4 se expresa predominantemente en testículos pero también tiene una expresión débil en placenta y tejido pulmonar (X. Sun et al., 2017).

**Tabla 3: Gen y localización de Catsper.** Se muestran el cromosoma, exón y residuo de aminoácido de las 4 subunidades  $\alpha$  (CatSper 1-4) y las 3 subunidades auxiliares ( $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).

Nombre del gen	Cromosoma	Exón	Aminoácido
<b>Catsper 1</b>	11q13.1	12	780
<b>Catsper 2</b>	15q15.3	14	530
<b>Catsper 3</b>	5q31.1	8	344
<b>Catsper 4</b>	1p36.11	11	472
<b>Catsper <math>\beta</math></b>	14q32.12	27	1116
<b>Catsper <math>\gamma</math></b>	19q13.2	36	1159
<b>Catsper <math>\delta</math></b>	19p13.3	25	798

### 2.5.3 Estímulos fisiológicos reguladores de CatSper

Existen diversas señales químicas vinculadas al proceso de la fertilización que involucran la acción del canal CatSper tales como, nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc), las glicoproteínas de la zona pelúcida, albúmina sérica bovina (BSA), pH alcalino (X. Sun et al., 2017), el líquido folicular, las prostaglandinas y hormonas esteroides (Pg, T, HC, estrógeno y sulfato de pregnenolona) (Brenker et al., 2012; Lishko et al., 2011; Lishko & Mannowetz, 2018a).

### 2.5.4 CatSper y hormonas esteroideas

El sistema reproductor masculino se encuentra regulado por diversos componentes endócrinos. En términos generales, una hormona es una señal química que proporciona información entre los diferentes órganos del cuerpo.

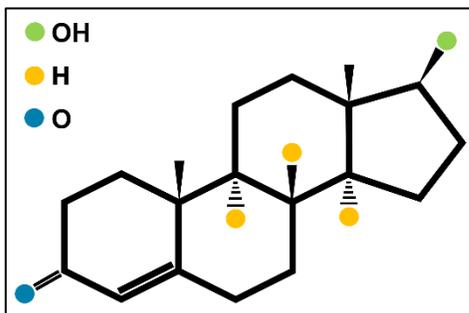
Existen 2 tipos de hormonas reproductivas:

- Hormonas peptídicas: Son aquellas que tienen naturaleza proteica y son incapaces de ingresar a la célula por lo que su contacto con las células blanco debe ocurrir a través de receptores que residen sobre la membrana plasmática. Dicho contacto hormona-receptor, dispara dentro de las células blanco segundos mensajeros. Entre ellas se encuentran la hormona folículo estimulante (FHS) y la hormona luteinizante (LH) las cuales activan de manera clásica a la adenosina monofosfato cíclico (AMPc) como segundo mensajero además de la activación de entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, proteína quinasa C, MAP cinasa y fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) (I. Huhtaniemi, 2010).
- Hormonas esteroideas: Son fundamentales para el desarrollo, metabolismo, inflamación, homeostásis de iones y reproducción. Éstas son capaces de atravesar las membranas celulares que actúan sobre receptores nucleares; es decir, son capaces de atravesar todo el organismo incluyendo el cerebro pero sólo actúan sobre células específicas. Dentro de estas hormonas se encuentran la T, HC, estrógeno y Pg.

Los espermatozoides se encuentran expuestos a diferentes hormonas esteroideas; desde su maduración en el tracto reproductor masculino (T) hasta el viaje que recorren por el TGF (estrógenos y Pg). Otra hormona esteroidea importante que se produce en individuos de ambos sexos durante períodos de estrés es la HC (cortisol). Esta hormona puede afectar también la función del espermatozoide ya que los altos niveles de ésta, se encuentran relacionados con la infertilidad (Lishko & Mannowetz, 2018a).

### 2.5.4.1 Testosterona

La T es una hormona pleiotrópica que tiene un peso molecular de 288.4 g/mol. Es la hormona androgénica más importante tanto en potencia como en cantidad ya que



de ella depende complementamente el sistema reproductor masculino por su participación en el desarrollo de los genitales masculinos desde el útero y en la pubertad (**Figura 10**) (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2021b; Patel et al., 2019).

**Figura 10: Estructura de la testosterona.** Esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno. Contiene 19 carbonos, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en el C3 y un radical OH en el C17. Su fórmula es  $C_{19}H_{28}O_2$

#### 2.5.4.1.1 Síntesis de la testosterona

La T es sintetizada y liberada por las células de Leydig que se encuentran ubicadas dentro de los túbulos seminíferos en el intersticio testicular (Luetjens & Weinbauer, 2011; National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2021b).

Las células de Leydig son la principal fuente de T y en hombres producen el 95% de esta hormona circulante. Aproximadamente del 10-20% del área intersticial es ocupada por las células de Leydig y los testículos contienen más o menos  $200 \times 10^6$  células de Leydig. Se estima que la T producida por día oscila alrededor de 6-7 mg (Luetjens & Weinbauer, 2011).

La célula de Leydig resulta muy importante ya que es la única célula capaz de expresar todas las enzimas necesarias para convertir el colesterol a T la cual puede ser también metabolizada a dihidrotestosterona (DHT) o estradiol (Luetjens & Weinbauer, 2011).

Debido a que las células de Leydig son incapaces de almacenar andrógenos, la biosíntesis de estos ocurre de manera continua.

La síntesis de T (**Figura 11**) se encuentra regulada por el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG) y se resumen a continuación (Ayaz & Howlett, 2015):

1. Liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH por sus siglas en inglés *Gonadotropin-releasing hormone*) la cual se sintetiza y secreta gracias a las neuronas ubicadas en el hipotálamo.

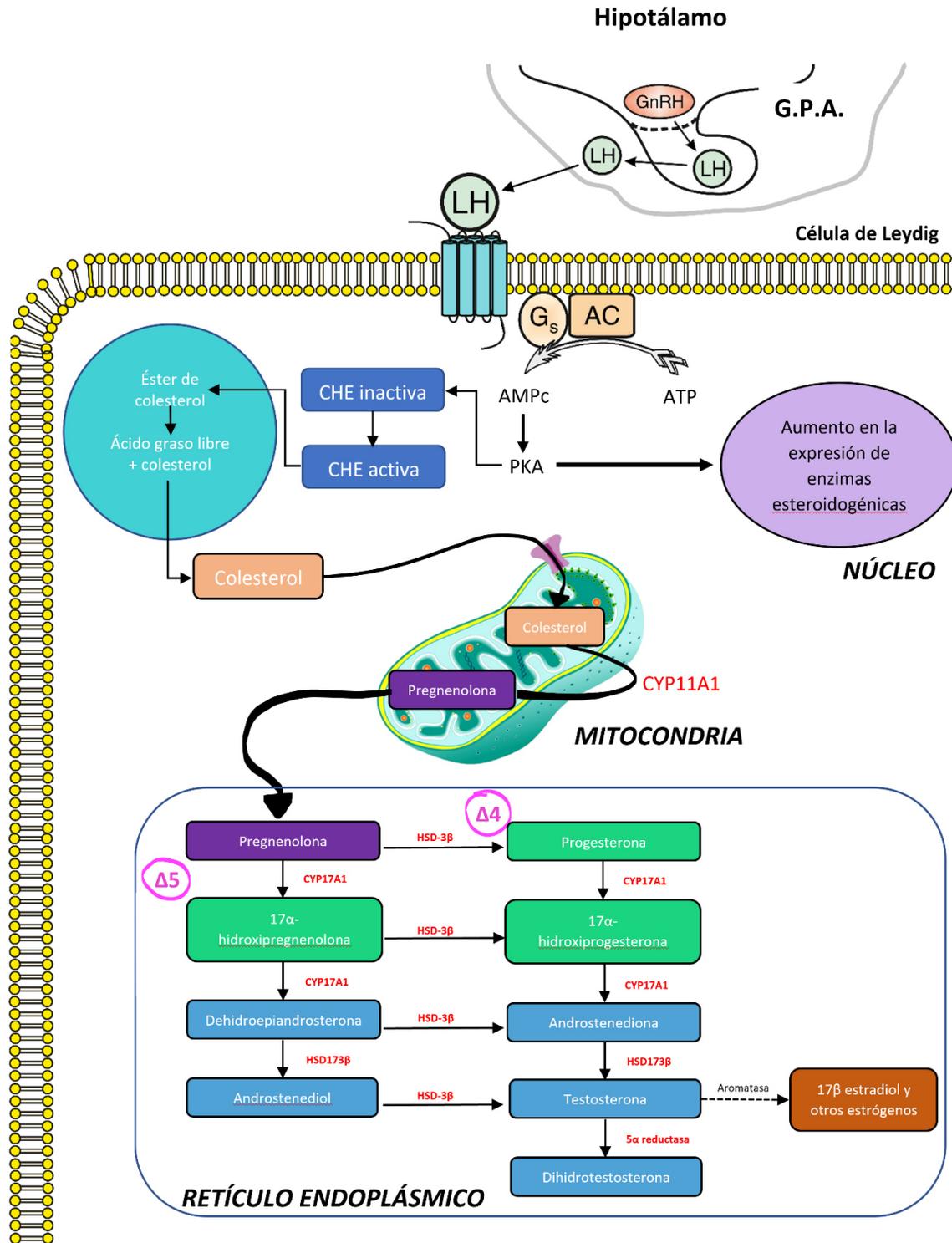
2. Unión de la GnRH con sus receptores en la glándula pituitaria anterior lo cual produce la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés *luteinizing hormone*) al torrente sanguíneo.
3. Unión de la LH a sus receptores en las células de Leydig en los testículos que provoca la estimulación de una proteína G, la  $G_s$ .
4. La proteína  $G_s$  activa la vía de señalización de la adenilato ciclasa, adenosín monofosfato (AMPc) y proteína quinasa A (PKA).
5. Dicha vía de señalización promueve el transporte de colesterol a la mitocondria a través de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) y se incrementa la activación transcripcional de genes que codifican para las enzimas necesarias para la síntesis de la T.
6. El colesterol es convertido a pregnenolona por la enzima citocromo P450 (CYP) (CYP11A1) la cual escinde la cadena lateral del colesterol.
7. Una vez que la pregnenolona se ha formado, difunde al retículo endoplásmico en donde la síntesis de T se puede dar por las vías  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ .

En la primera, la pregnenolona se convierte a Pg por la enzima deshidrogenasa 3 $\beta$ -hidroxiesteroide (HSD3 $\beta$ ). Posterior a ello, la enzima CYP17A1 convierte la Pg a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona gracias a una reacción de hidroxilación. Luego, mediante una reacción de lisis, éste último sustrato se convierte a androstenediona para que finalmente, mediante la enzima 3 deshidrogenasa 17 $\beta$ -hidroxiesteroide (HSD17 $\beta$ 3) se forme la T.

En la segunda, la pregnenolona se convierte a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona mediante la enzima CYP17A1 a través de una reacción de hidroxilación. Luego, este sustrato sufre una reacción de lisis y se convierte a dehidroespiandrosterona (DHEA). Posteriormente, el DHEA se convierte en androstenediona por la enzima HSD3 $\beta$ . Finalmente, la enzima HSD17 $\beta$ 3 convierte a la androstenediona a T, aunque también el DHEA puede convertirse a androstenediol por la HSD17 $\beta$ 3 y transformarse en un último paso a T por la enzima HSD3 $\beta$ .

8. La T también se puede convertir en otro andrógeno muy potente, la dihidrotestosterona (DHT) por la 5 $\alpha$ -reductasa.

De manera adicional, la T puede convertirse al  $17\beta$ -estradiol por la enzima aromatasa. Esta vía de señalización ocurre en las células de Leydig en una mínima frecuencia. Sin embargo, la aromatasa se encuentra presente en diversos sitios extra gonadales como tejido adiposo, hueso y cerebro en ambos sexos (Ayaz & Howlett, 2015).



**Figura 11: Síntesis de la testosterona.** La GnRH secretada por el hipotálamo provoca la liberación de la LH de la pituitaria. La LH se une con sus receptores en la célula de Leydig y estimula a G<sub>s</sub> que activa la vía de señalización AMPc/PKA. La PKA provoca el transporte del colesterol a la mitocondria e incrementa la transcripción de genes involucrados con la síntesis de T. El colesterol se convierte a pregnenolona y difunde a través del retículo endoplásmico para seguir la vía Δ4 o Δ5 hasta convertirse en T por la HSD173β o por la HSD3β, respectivamente. Finalmente, la T puede convertirse a dihidrotestosterona o a estradiol. GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, LH: hormona luteinizante, G.P.A.: glándula pituitaria anterior, AC: adenilato ciclasa, G<sub>s</sub>: Tipo de proteína G, AMPc: adenosín monofosfato cíclico, ATP: adenosín trifosfato, PKA: proteína quinasa A, CHE: colesterol éster hidrolasa, CYP: citocromo p450, HSD: deshidrogenasa hidroxisteroide. Tomada y adaptada de Ayaz & Howlett, 2015.

#### **2.5.4.1.2 Transporte de la testosterona**

La T que se transporta por el plasma, puede ser dividida en tres fracciones: fracción unida a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), fracción unida a la albúmina y fracción libre (fracción activa) (Gil & Martínez, 2010).

Ésta se encuentra unida principalmente a la albúmina o a la SHBG (producida en los hepatocitos) (Luetjens & Weinbauer, 2011).

En los hombres, únicamente el 2% de la T total circula de manera libre por la sangre mientras que un 44% se encuentra unida al SHBG y un 54% a la albúmina. Es de importancia mencionar que la afinidad de unión de la T a la albúmina es 100 veces menor comparado con la SHBG. Sin embargo, dado que la concentración de albúmina es mucho mayor que la de SHBG, la capacidad de unión de ambas proteínas por la T es muy similar (Luetjens & Weinbauer, 2011).

La T también es capaz de disociarse de las proteínas de unión; esto ocurre principalmente en los capilares, ya que la interacción de las proteínas de unión con el glicocálix endotelial lleva a una modificación estructural del sitio de unión hormonal y por consiguiente a un cambio en la afinidad. Como resultado, la T puede viajar de manera libre y puede difundir libremente a las células blanco (Luetjens & Weinbauer, 2011).

#### **2.5.4.1.3 Regulación de la testosterona**

Como se mencionó anteriormente, la T en adultos sanos se encuentra regulada por el eje hipotálamo pituitario gonadal (HPG) el cual se explicará de manera más detallada en este apartado (**Figura 12**).

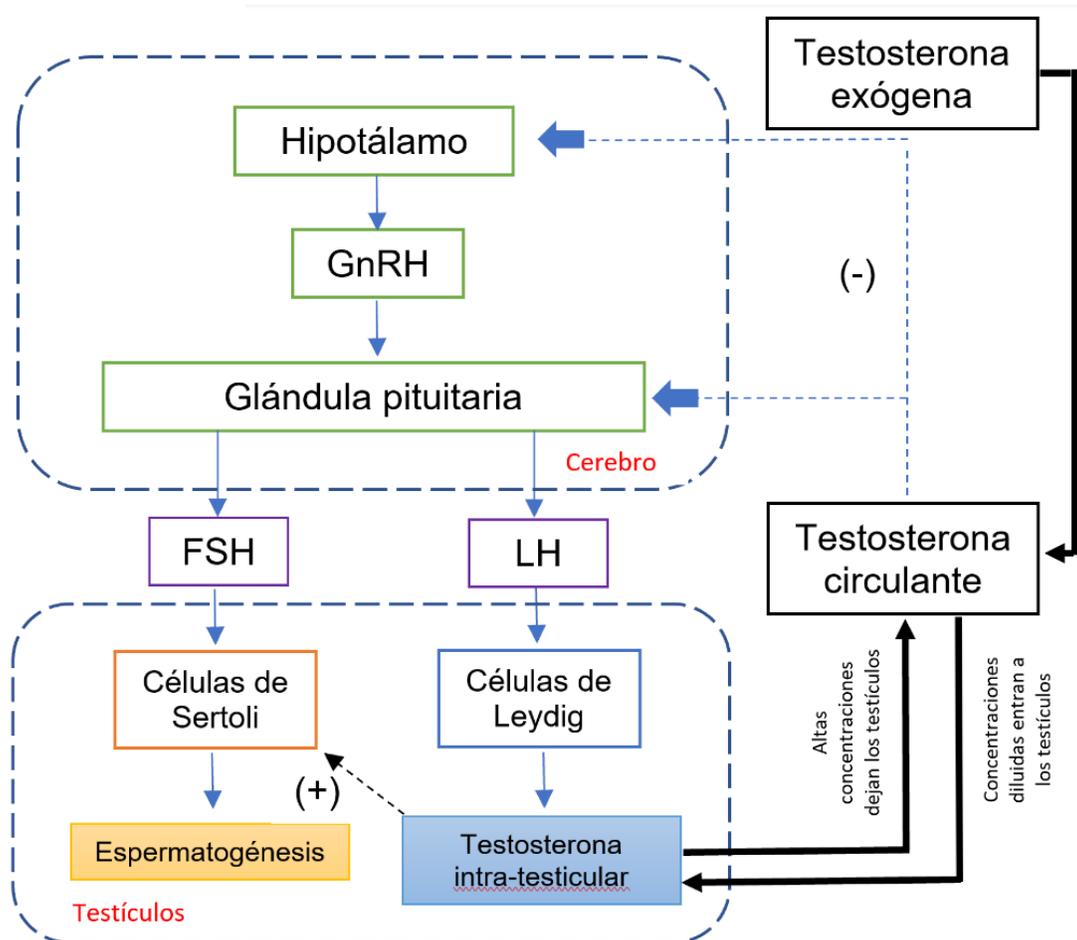
Los centros corticales superiores del cerebro, le indican al hipotálamo que secrete la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en forma de pulso; ésta a su vez actúa uniéndose a sus receptores específicos de membrana ubicados en la superficie de las células hipofisarias secretoras de las siguientes hormonas:

- Hormona folículo estimulante (FSH): Estimula a las células germinales (espermatogonias) para llevar a cabo la espermatogénesis. La FSH se une a sus receptores en las células de Sertoli y estimula la vía de segundo

mensajero mediado por AMPc la cual es requerida para la producción de espermátidas (Sanderson, 2006).

- Hormona luteinizante (LH): Regula los niveles de T intratesticular *de novo* a partir del colesterol mediante su unión con el receptor en la membrana de la célula de Leydig, la cual también activa a la vía de señalización de AMPc. (Patel et al., 2019; Sanderson, 2006).

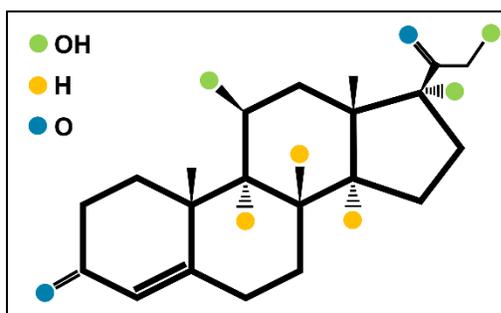
Una vez que la T va en aumento, hay una regulación negativa sobre los receptores de andrógenos tanto en neuronas del hipotálamo como en la glándula pituitaria lo que resulta en una inhibición en la liberación de GnRH, FSH y LH (Patel et al., 2019).



**Figura 12: Regulación de la testosterona.** Una vez que el hipotálamo ha secretado la GnRH, estimula a la glándula pituitaria para liberar FSH y LH las cuales tienen sus receptores en las células de Sertoli y Leydig, respectivamente. Una vez unidas, desencadenan el proceso de espermatogénesis o de síntesis de T. Cuando la T se incrementa en el torrente sanguíneo, el eje HPG, se retroalimenta de manera negativa inhibiendo su síntesis. GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, FSH: hormona folículo estimulante, LH: hormona luteinizante. Tomada y adaptada de Patel., 2019.

### 2.5.4.2 Hidrocortisona

La HC es el término farmacéutico que se refiere al cortisol que se produce en el laboratorio, es decir, la forma sintética del cortisol. Es la principal hormona glucocorticoide adrenal (corticoesteroidea) secretada en la zona fasciculada en la corteza adrenal (**Figura 13**) (Hossain et al., 2019; Pan et al., 2018) la cual tiene un peso molecular de 362.5 g/mol (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2021a). Debido a la gran cantidad de receptores



*Figura 13: Estructura de la hidrocortisona. Esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno. Contiene 21 carbonos, un doble enlace entre C4 y C5, dos átomos de oxígeno en el C3 y C19 y tres radicales OH en el C11, C17 y C21. Su fórmula es  $C_{21}H_{30}O_5$ .*

glucocorticoides, el cortisol puede afectar diversos sistemas como el músculo-esquelético, cardiovascular, respiratorio, endócrino, nervioso e inmunológico (Thau & Sharma, 2020). Algunos ejemplos son el control del estrés, niveles de glucosa sanguínea, respuestas inflamatorias y presión arterial (Thau & Sharma, 2020). La producción de cortisol en un día es oscila entre 9.5-9.9 mg (Hossain et al., 2019).

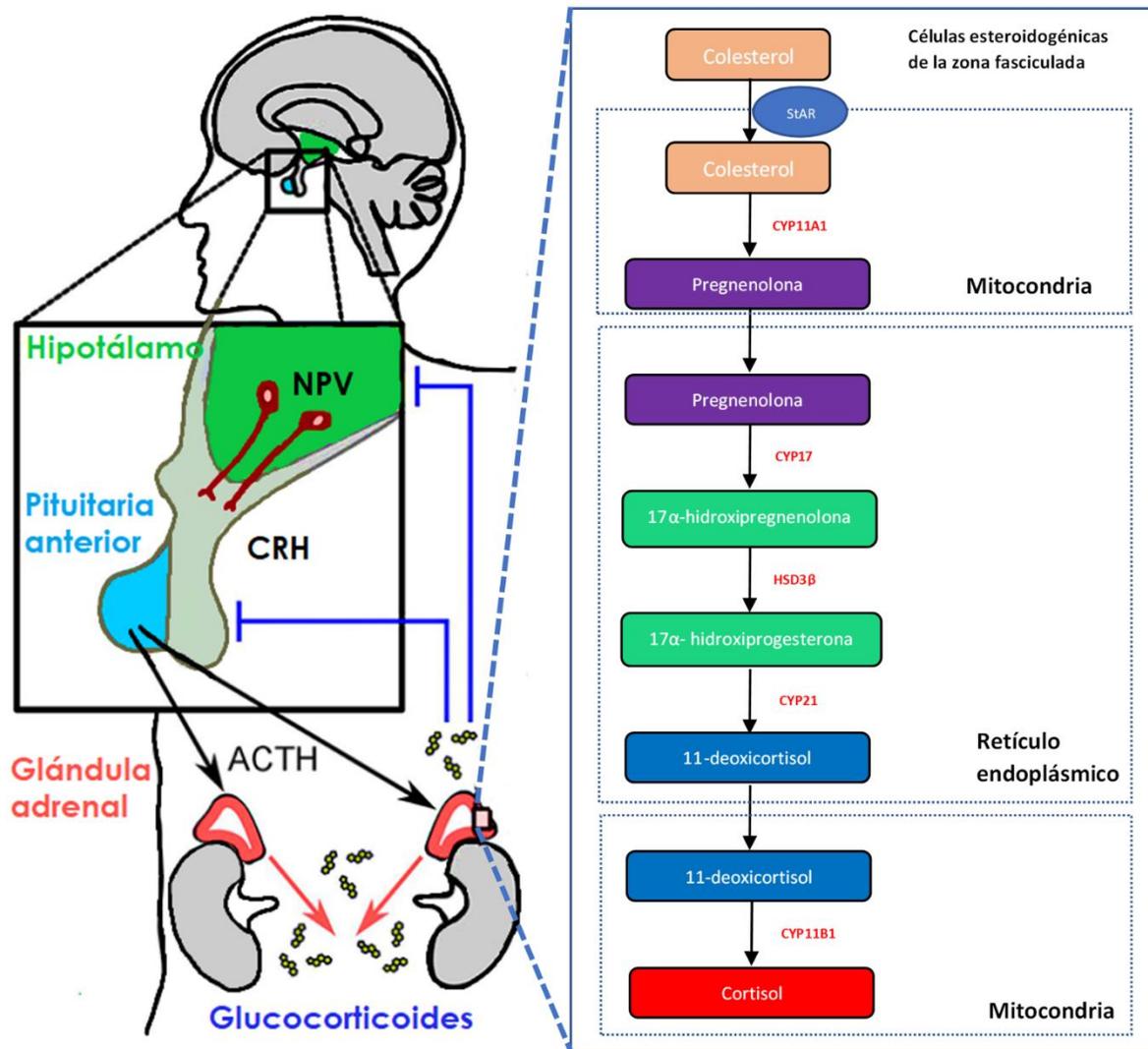
#### 2.5.4.2.1 Síntesis de la hidrocortisona

Los glucocorticoides adrenales son sintetizados y liberados en la zona fasciculada de la corteza adrenal. En el caso del cortisol, igual que la T, es sintetizado a partir del colesterol y se encuentra regulado gracias a las enzimas del CYP450 que incluyen oxidasas y deshidrogenasas hidroxisteroides (Ahmed et al., 2019; Guerrero, 2017).

El primer paso de la síntesis tiene lugar en la mitocondria en donde el colesterol pasa de la membrana externa a la interna gracias al transportador StAR. Una vez que el colesterol se encuentra en la mitocondria, se convierte a pregnenolona por acción de la CYP11A1 que corta la cadena lateral del colesterol.

Después, la pregnenolona sufre una hidroxilación convirtiéndose a  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona por la enzima CYP17. Posteriormente, ésta se convierte a Pg por la HSD- $3\beta$  para que luego, la enzima CYP21 dé lugar al 11-deoxicortisol. Luego,

la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa cataliza la última hidroxilación convirtiendo al 11-deoxicortisol a cortisol (**Figura 14**).



**Figura 14: Síntesis y regulación de la hidrocortisona.** La HC se encuentra regulada bajo el eje HPA el cual inicia por acción del hipotálamo (verde) que le da la señal al NPV para secretar CRH. Ésta estimula a la glándula pituitaria (azul) para liberar la ACTH que estimulará a la corteza adrenal (rojo) la cual tiene como finalidad liberar glucocorticoides. En este caso particular, la síntesis del cortisol se lleva a cabo en la zona fasciculada de la corteza adrenal. Se sintetiza a partir del colesterol el cual pasa a la mitocondria mediante el transportador StAR. Una vez allí, se convierte en pregnenolona por la enzima CYP11A1. La pregnenolona se convierte a 17 $\alpha$  (OH) pregnenolona gracias a la enzima CYP17. Después otra enzima (HSD-3 $\beta$ ), convierte este sustrato en 17 $\alpha$  (OH) Pg que posteriormente se convierte a 11-deoxicortisol. Todo lo anterior tiene lugar en el retículo endoplásmico. El 11-deoxicortisol se incorpora nuevamente a la mitocondria y mediante la enzima CYP11B1 se convierte finalmente en cortisol. NPV: núcleo paraventricular, CRH: hormona liberadora de corticotropina, ACTH: hormona adrenocorticotropa, StAR: proteína reguladora aguda esteroidogénica, CYP: citocromo p450, HSD: deshidrogenasa hidroxisteroidea. Tomada y adaptada de Ahmed et al., 2019.

#### 2.5.4.2.2 Transporte de la hidrocortisona

Alrededor del 90% del cortisol que se encuentra en el suero, circula unido a la globulina de unión a cortisol (CBG por sus siglas en inglés *cortisol-binding globulin*), 5% a proteínas de unión genéricas (albúmina y glicoproteína  $\alpha$ -1) y el 5% restante viaja de manera libre y se convierte en cortisona por la enzima 11 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ HSD) tipo 2 que se expresa en tejidos blancos selectivos de aldosterona (nefrona distal, colon, glándulas salivales y piel) (Blair et al., 2017).

#### 2.5.4.2.3 Regulación de la hidrocortisona

El cortisol se encuentra regulado de acuerdo con el ritmo circadiano; los niveles de esta hormona comienzan a incrementar alrededor de las 02:00-04:00 am y presenta un pico poco después de que los individuos despierten. Posterior a esto, disminuye a lo largo del día para alcanzar su punto más bajo durante la noche (Blair et al., 2017).

El cortisol se encuentra bajo el mando del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y tiene efecto a nivel de todos los tejidos y procesos del organismo (Wester & van Rossum, 2015).

La producción se inicia en el hipotálamo, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es secretada del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Hossain et al., 2019). Luego, la CRH estimula la glándula pituitaria anterior para liberar la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual es una hormona que estimula la corteza adrenal para liberar glucocorticoides como el cortisol. El eje HPA es un sistema de retroalimentación negativa en donde si existe presencia del cortisol, la producción de CRH y ACTH se inhiben (Thau & Sharma, 2020) (**Figura 14**).

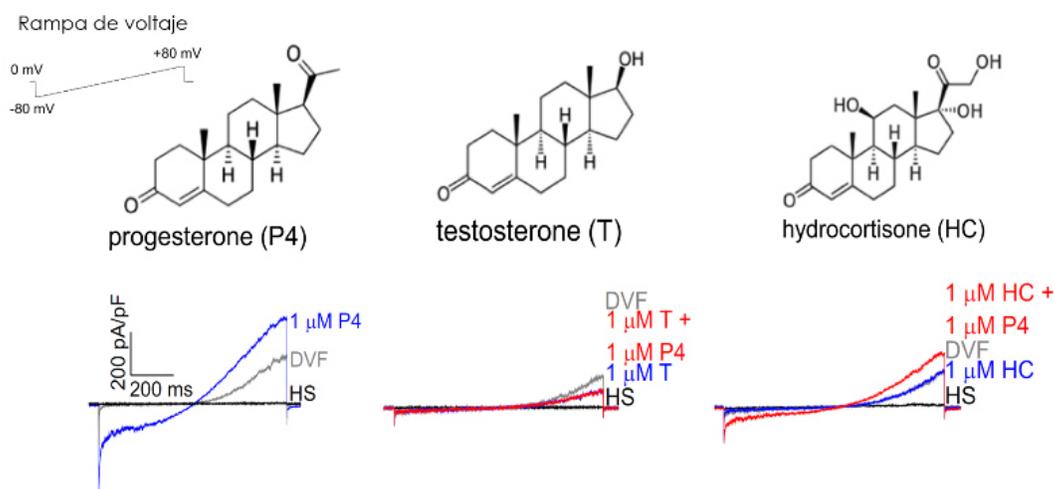
Las glándulas adrenales se encuentran ubicadas en la parte superior de los riñones; están compuestas de una medula interna y corteza externa. La corteza externa es responsable de la producción de hormonas esteroideas como mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales. La corteza está compuesta de tres capas, la zona glomerulosa, zona fasciculada y la zona reticular. La zona fasciculada es responsable de producir cortisol (Thau & Sharma, 2020; Wester & van Rossum, 2015).

### 2.5.4.3 Testosterona, hidrocortisona y su relación con CatSper

Actualmente, existe poca información sobre el impacto que tienen las hormonas esteroideas sobre CatSper.

Con respecto a dicha asociación, Mannowetz y col, realizaron un estudio en el 2017 mediante electrofisiología con el objetivo de explorar la influencia de diversas hormonas esteroideas como la T, estrógeno e HC sobre la activación de CatSper. Este grupo de investigación encontró que estas tres hormonas no activan a CatSper si no que reducen o previenen su activación por Pg (Mannowetz et al., 2017).

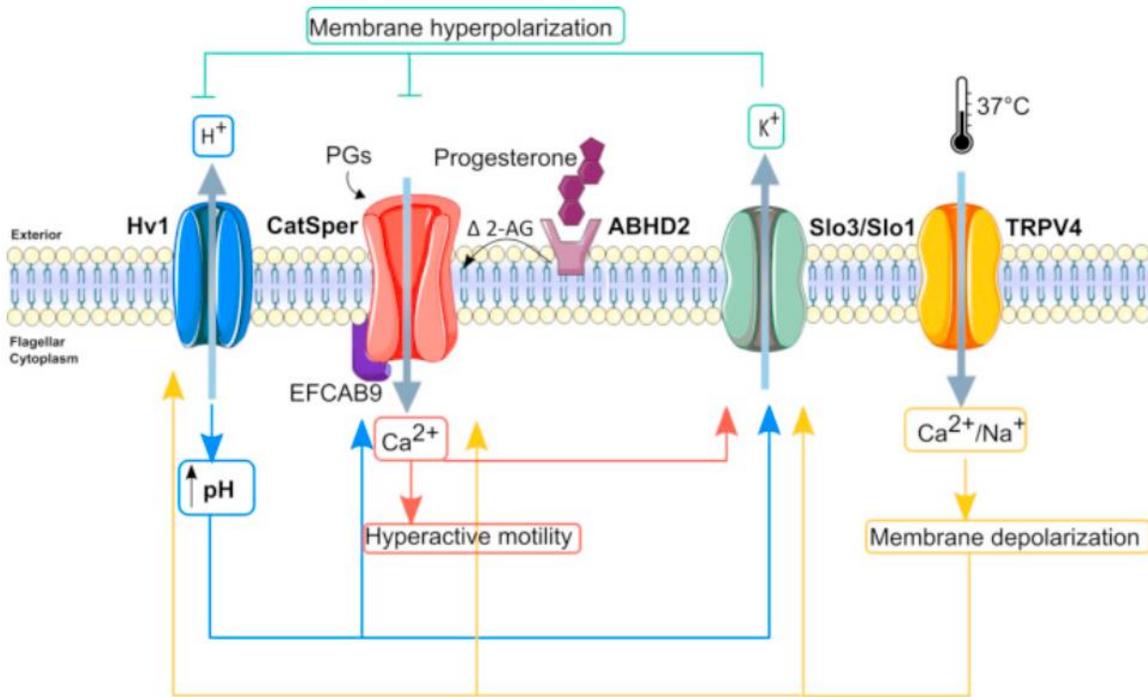
En el caso de la T e HC, los efectos fueron más fuertes con una inhibición significativa de CatSper mediado por Pg; estos efectos fueron reflejados empleando concentraciones fisiológicas de dichas hormonas esteroideas (1  $\mu$ M) (**Figura 15**).



**Figura 15:** Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper. La exposición a T e HC 1  $\mu$ M previenen la activación de CatSper por Pg. Tomada de Mannowetz y col. 2017.

Una de las hipótesis que este grupo de investigación propone, es que la T es capaz de unirse con mucha mayor afinidad que la Pg a una enzima de CatSper llamada proteína 2 contenedora de dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa (ABHD2). Esta enzima se encarga de degradar al 2-araquidonoilglicerol (2-AG), el cual es un inhibidor endógeno de CatSper que depende de la Pg. De esta manera, si se une la T a ABHD2, el inhibidor 2-AG no podrá ser degradado por lo que inhibiría la activación de CatSper

(Mannowetz et al., 2017; Rahban & Nef, 2020). Los mecanismos farmacológicos de unión de esteroides a esta enzima aún se desconocen (Jeschke et al., 2021).



**Figura 16: Activación/inhibición de CatSper:** Para que pueda ocurrir la activación de CatSper, se requieren diversos eventos: a) hiperpolarización de la membrana, b) pH alcalino, c) Pg. Una vez que el espermatozoide se encuentra cerca del sitio de fertilización, el canal de sodio TRPV4 (también conocido como DSper) se activa ya que la temperatura incrementa y esto provoca una despolarización de la membrana seguido de un eflujo de Na<sup>+</sup>. En consecuencia, se activarán los canales Hv1 y CatSper lo que producirá una expulsión de iones protones a través de Hv1 así como la activación de CatSper gracias al medio alcalino intracelular. De forma paralela, la Pg se unirá al ABHD2 provocando que el inhibidor de CatSper 2-AG sea liberado para finalmente promover el influjo de Ca<sup>2+</sup> a través de CatSper y el eflujo de K<sup>+</sup> por el canal Slo3 (también conocido como KSper). Dicho influjo de calcio será capaz de inducir la motilidad hiperactivada y eflujo de K<sup>+</sup> que finalmente producirá una hiperpolarización de la membrana y una regulación de CatSper mediante retroalimentación negativa (Tomada de Rahban & Nef, 2020).

Según el estudio realizado por Mannowetz y col., para que se lleve a cabo la activación de CatSper, se requiere una concentración mínima de Pg de 10 pM, siendo su concentración efectiva media de 7.7 nM, mientras que la concentración sérica de Pg en un hombre es alrededor de 2 nM (Lishko et al., 2011). Dicha hormona fue capaz de bloquear la activación de Catsper incluso en presencia de una concentración menor (1 μM) la cual se encuentra dentro de los parámetros

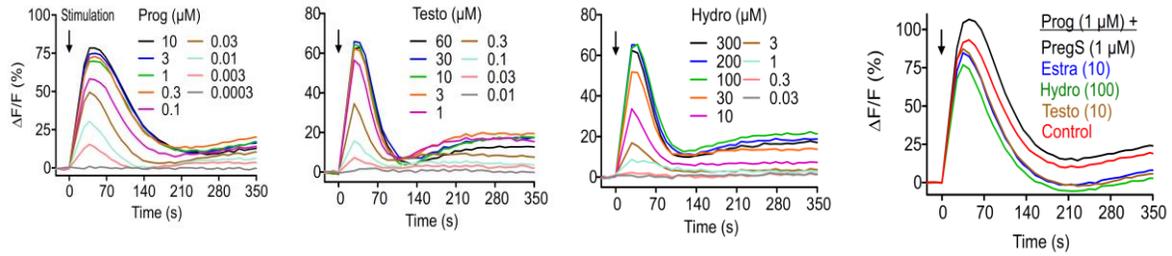
fisiológicos (Mannowetz et al., 2017) ya que la T plasmática alcanza una concentración de 2  $\mu\text{M}$  (Schwartz et al., 1980).

Los resultados de este grupo de investigación permiten hipotetizar que las altas concentraciones de T en el TGM impiden la activación de CatSper de tal manera que, la T podría funcionar como un factor anti-capacitante. Una vez removida esta T por la albúmina en el TGF se permitiría la activación del canal (Mannowetz et al., 2017).

Sin embargo, podrían existir también niveles elevados de T en la mujer; estos se asocian con el síndrome de ovario poliquístico el cuál afecta del 5-8% de las mujeres en edades reproductivas. Este síndrome se caracteriza por presentar un desbalance hormonal como la sobreproducción de T e HC las cuales prevalecen sobre las hormonas femeninas estrógenos y Pg.

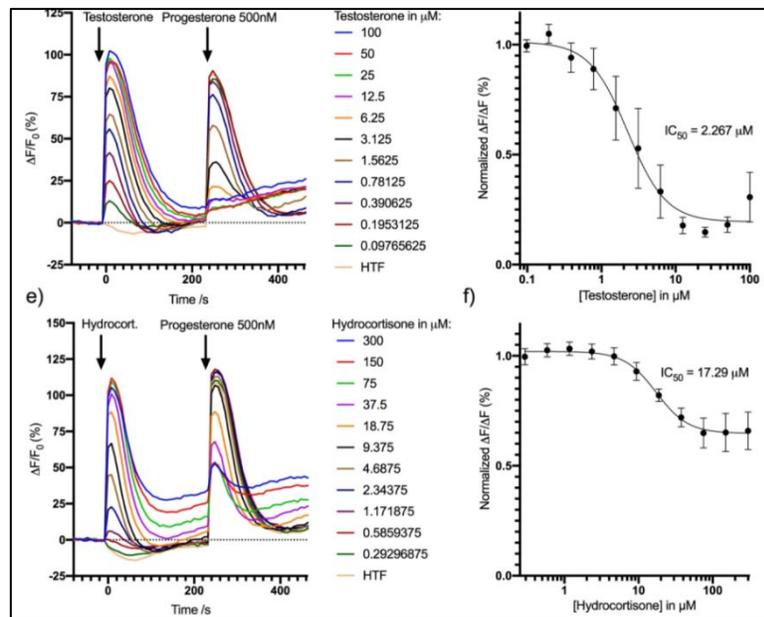
Dicho desbalance, produce una ovulación deteriorada e infertilidad en aproximadamente el 50% de las mujeres con este síndrome. De allí, que sea posible que los niveles elevados de hormonas androgénicas e HC en el TGF puedan impactar de manera sinérgica deteriorando la función de CatSper; es decir, se vería afectada la motilidad hiperactivada y por lo tanto, la progresión de los espermatozoides hacia las trompas de Falopio para producir la fertilización (Lishko & Mannowetz, 2018a).

Por el contrario, un estudio realizado por Brenker y col. y recientemente por Rehfeld, difieren en la mayor parte de los resultados obtenidos por Mannowetz y col. Este grupo de investigación reportó que estas tres hormonas (P, T e HC) aumentan las corrientes de CatSper y estimulan el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante Catsper a pesar de su diferencia en potencia y eficacia (**Figura 16**) (Brenker et al., 2018; Rehfeld, 2020). Además, encontraron que en lugar de ser antagonistas de Catsper, estas hormonas tienen el efecto contrario sobre el canal, ya que inclusive la aplicación de estas hormonas en conjunto con la Pg no antagonizan su efecto (**Figura 17**) (Brenker et al., 2018; Rehfeld, 2020).



**Figura 17: Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper.**

La T e HC aumentan las corrientes de CatSper a pesar de su diferencia en potencia y eficacia. Por lo tanto, estas hormonas tienen un efecto agonista sobre CatSper incluso en la aplicación conjunta de estas hormonas más la Pg. Tomada de Brenker y col. 2018.



**Figura 18: Efecto de hormonas esteroideas sobre la activación de CatSper.**

La T e HC aumentan las corrientes de CatSper a pesar de su diferencia en potencia y eficacia. Por lo tanto, estas hormonas tienen un efecto agonista sobre CatSper incluso en la aplicación conjunta de estas hormonas más la Pg. Tomada de Rehfeld, 2020.

A pesar de la controversia entre resultados, es importante destacar que dentro de las clínicas de reproducción, no se realizan mediciones de cortisol. Sin embargo, se ha reportado un incremento en los niveles de estrés de aquellas parejas que se encuentran bajo tratamientos de fertilidad; por lo que podría ser un punto importante para valorar (Lamprou et al., 2021).

## **2.6 JUSTIFICACIÓN**

Mundialmente el 15% de las parejas presentan problemas de infertilidad. De este 15%, el 30% de los casos se deben a factores masculinos y otro 30% se atribuye a causas desconocidas.

Para que pueda ocurrir una fecundación, el espermatozoide debe atravesar por los procesos de capacitación y reacción acrosomal en los cuales interviene CatSper ya que media la hiperactivación flagelar, aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reacción acrosomal, entre otros.

La Pg es una de las principales hormonas que induce la activación de CatSper. Al ser ésta una hormona esteroidea, es importante conocer qué efecto tienen otras hormonas de carácter esteroideo como la T y la HC sobre Catsper ya que podrían estar jugando un papel crucial en la infertilidad atribuida a ambos sexos.

Actualmente, existe una gran controversia acerca de cómo las hormonas esteroideas impactan en el funcionamiento de CatSper. Recientemente, algunos grupos de investigación obtuvieron resultados en su mayoría contradictorios por lo que es necesario realizar más investigación.

Además, es relevante mencionar que estos estudios no realizaron la cuantificación de la reacción acrosomal, cuyo proceso que es necesario para que la fertilización del óvulo pueda llevarse a cabo.

## **2.7 HIPÓTESIS**

La testosterona y la hidrocortisona inhibirán por sí solas la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

## **2.8 OBJETIVOS**

### **2.8.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la testosterona e hidrocortisona sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

## **2.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los porcentajes de reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de humano incubados con diferentes concentraciones de testosterona e hidrocortisona.
2. Determinar los porcentajes de reacción acrosomal inducida por progesterona en el espermatozoide de humano incubado con diferentes concentraciones de testosterona e hidrocortisona durante y después de la capacitación.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Diseño**

Este estudio fue de tipo transversal, exploratorio, cuantitativo.

### **3.2 Definición de universo**

Participantes del sexo masculino entre 18 a 45 años que cumplieran con los parámetros de calidad de la OMS y que desearan participar en el estudio.

### **3.3 Tamaño de la muestra**

Se incluyó un tamaño de muestra de 49 participantes.

### **3.4 Criterios de selección de participantes**

#### **3.4.1 Criterios de inclusión**

- Hombres entre 18 a 45 años que cumplieran con los parámetros de calidad de la OMS.
- Que presentaran de 2 a 7 días de abstinencia sexual.

#### **3.4.2 Criterios de exclusión**

- Que presentaran dependencia a cualquier sustancia.
- Que padecieran enfermedades de transmisión sexual.

- Que presentaran alguna infección en los últimos 3 meses.
- Que se realizaran la vasectomía.

#### **3.4.3 Criterios de eliminación**

- Que no cumplieran con los criterios para ingresar en el estudio.
- Que no firmaran el consentimiento informado.
- Que desearon abandonar el estudio.

### **3.5 Reclutamiento de participantes**

Se realizó una invitación dirigida a todos los hombres entre 18 a 45 años que desearan participar en la investigación la cual se llevó a cabo en instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro (FMUAQ).

Se le explicó al participante la naturaleza del estudio y se resolvió cualquier duda que tuviera.

En caso de que el participante decidiera participar en el estudio, se le entregó una carta de consentimiento informado (**Anexo 1**) en donde se establecieron de manera detallada todos los requisitos necesarios para ingresar al estudio, así como todos los procedimientos a realizar durante el transcurso de este.

### **3.6 Recolección de la muestra**

Se solicitó a los participantes presentar una abstinencia sexual de 2 a 7 días para la donación de una muestra de semen. La muestra se recolectó en un frasco estéril que se le proporcionó al participante; se dieron indicaciones sobre el transporte de la muestra a las instalaciones de la Facultad de Medicina, UAQ.

### **3.7 Análisis macroscópico**

Se realizó un espermograma de la muestra para determinar parámetros como el color, volumen, viscosidad y pH de acuerdo con los lineamientos de la OMS.

Para realizar la determinación de éstos, la muestra obtenida se almacenó en una incubadora durante 30 minutos para que se llevara a cabo el proceso de licuefacción.

Para determinar el color de la muestra, se levantó el frasco en donde se encontraba contenida la muestra. Después, con ayuda de una pipeta estéril de 5 ml, se aspiró la muestra para medir el volumen y se dejaron caer algunas gotas de esta para determinar la viscosidad.

Finalmente, para conocer el pH, se colocó una pequeña gota de muestra sobre una tira reactiva de pH y luego de 20 segundos se comparó con los colores indicados según el proveedor.

### **3.8 Análisis microscópico**

Así mismo, se realizó el conteo de parámetros microscópicos como motilidad, concentración espermática y morfología de acuerdo con los lineamientos de la OMS; es decir, que la célula espermática presente una cabeza y cola normales:

- ✓ La cabeza debe ser lisa, con contorno regular y de forma ovalada.
- ✓ La región acrosomal debe comprender entre el 40 al 70% de la cabeza y no debe presentar vacuolas que ocupen más del 20% de la cabeza. Así mismo, la región post-acrosómica no debe contener vacuolas.
- ✓ La pieza media debe ser aproximadamente de la misma longitud que la cabeza y deberá estar alineada con el eje principal de la cabeza del espermatozoide.
- ✓ La pieza principal debe ser más delgada que la pieza intermedia; puede enrollarse sobre sí misma siempre y cuando no exista un ángulo agudo que indique una ruptura flagelar.

Para cuantificar la motilidad de los espermatozoides, la muestra se mezcló y se colocaron 10  $\mu$ l de la muestra en un portaobjetos con su cubreobjetos correspondiente (22 mm x 22 mm).

El portaobjetos se observó al microscopio y se determinó en 200 células espermáticas el tipo de motilidad:

- Motilidad progresiva (tienen un movimiento activo)
- Motilidad no progresiva (tienen un movimiento, pero no tienen una progresión)
- Inmóviles (no tienen movimiento)

Para determinar la concentración de espermatozoides, con el mismo portaobjetos utilizado anteriormente, se cuantificó el número de espermatozoides en un solo campo.

Posterior a ello, se empleó una cámara de Neubauer la cual se limpió con alcohol al 70% y un kimwipe y se humedeció la superficie de la cámara para una mejor capilaridad.

Se cubrió la cámara de Neubauer con su cubreobjetos correspondiente y dependiendo del número de espermatozoides contados, se realizó la dilución correspondiente:

- < 101 células = 1:20 (50 µl de muestra (ORIGINAL) + 950 µl de fijativo)
- 16 – 100 células = 1:5 (50 µl de muestra (ORIGINAL) + 200 µl de fijativo)
- 2 – 15 células = 1:2 (50 µl de muestra (ORIGINAL) + 50 µl de fijativo)

Después, con ayuda de una pipeta, se resuspendió la mezcla con un mínimo de 10 veces y se colocaron 10 µl de la mezcla en la cámara de Neubauer. Se dejó reposar durante 5 minutos y se observó al microscopio en 40X para contar 200 células espermáticas en filas. Una vez contados, se aplicó la siguiente fórmula para obtener la concentración de espermatozoides:

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6 \times \text{ml obtenidos de la muestra}$$

Finalmente, para determinar la morfología de los espermatozoides, se colocaron 20 µl de la muestra en la orilla de un portaobjetos para realizar un frotis; esto con la ayuda de un cubreobjetos arrastrando la gota de muestra en un ángulo de 45°. Se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el cubreobjetos se sumergió en las siguientes soluciones:

1. Metanol durante 15 segundos para fijar la muestra.

2. Eosina durante 10 segundos.
3. Hematoxilina durante 5 segundos.

Se eliminó el exceso de tinción con un chorro de agua y se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente.

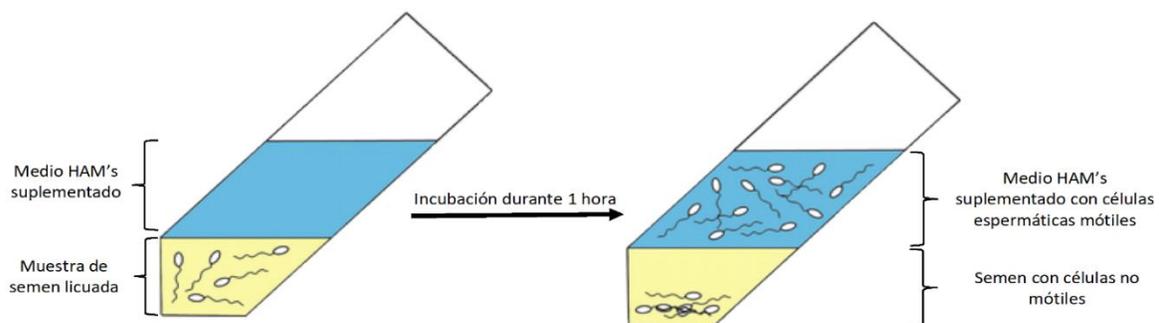
### 3.9 Preparación de la muestra de espermatozoides por método de “Swim up”

Las muestras se sometieron a un proceso de licuefacción dentro de una incubadora por 30 minutos a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%.

Posterior a ello, se realizó la separación de espermatozoides móviles por el método “swim up” en donde la totalidad de la muestra de semen se colocó dentro de un tubo Falcon a 45° de inclinación. Se agregó medio HAM’S F-10 suplementado con 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) en una relación 1:1 con respecto a la muestra y se incubó durante 1 hora con las mismas condiciones establecidas anteriormente (**Figura 19**).

Después se extrajo la fase superior y se colocaron 10 µl en un portaobjetos para realizar el conteo de células móviles en el microscopio en un solo campo. Dependiendo del número de espermatozoides, se realizó la dilución correspondiente para ajustar dicha concentración a  $1 \times 10^7$  células/ml con medio HAM’s suplementado.

- < 101 células = 1:20 (50 µl de muestra + 950 µl de fijativo)
- 16 – 100 células = 1:5 (50 µl de muestra + 200 µl de fijativo)
- 2 – 15 células = 1:2 (50 µl de muestra + 50 µl de fijativo).



**Figura 19: Método Swim up.** Se añade a la muestra medio HAM’s suplementado con la finalidad de que los espermatozoides móviles migren hacia la fase superior del medio después de incubar durante 1 hora.

Una vez ajustada la concentración espermática, las muestras fueron procesadas con distintos tratamientos como se explica a continuación en la **Tabla 4**:

**Tabla 4: Tratamiento de muestras con la técnica Azul de Coomassie.** Se emplearon 4 tratamientos para explorar el efecto de T e HC sobre la reacción acrosomal espontánea e inducida por Pg.

Técnica	Tratamiento	Procesamiento
Azul de Coomassie	1	Cada muestra fue dividida en 2: 1. Las muestras se capacitaron durante 3 horas y posteriormente se agregó HC o T durante 30 minutos (RA espontánea). 2. Las muestras se capacitaron durante 3 horas y posteriormente se agregó HC o T más Pg durante 30 minutos (RA inducida).
	2	Cada muestra fue dividida en 2: 1. Las muestras se capacitaron en presencia de T o HC durante 3 horas (RA espontánea). 2. Las muestras se capacitaron en presencia de T o HC durante 3 horas y posteriormente se añadió Pg durante 30 minutos (RA inducida).
Con la finalidad de conocer si los tiempos de incubación con <b>HC</b> afectan la RA, se realizaron los siguientes experimentos:		
FITC-PSA	3	Cada muestra fue dividida en 2: 1. Las muestras se capacitaron durante 2h y posteriormente se agregó HC durante 1h (RA espontánea). 2. Las muestras se capacitaron durante 2h, posteriormente se agregó HC durante 1h y finalmente se incubaron con Pg durante 30 min (RA inducida).

Las concentraciones de T utilizadas en los diferentes experimentos fueron 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$  y en cuanto a la HC se emplearon concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, 30 y 100  $\mu\text{M}$ . Dichas concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo con las concentraciones fisiológicas que han sido reportadas previamente

en líquido folicular tanto para T (Costa et al., 2004; Fuentes et al., 2019; Li et al., 2018; Yang et al., 2015) así como para cortisol (Andersen, 2002; Fateh et al., 1989; Jimena et al., 1992; Lewicka et al., 2003; Mantzavinos et al., 1997). Además, se tomaron en cuenta las concentraciones que han sido empleadas en experimentos realizados con hormonas sintéticas (Brenker et al., 2018; Mannowetz et al., 2017; Rehfeld, 2020).

Cada muestra se corrió con sus respectivos controles positivo (Pg 20  $\mu$ M) y negativo (DMSO para HC y medio HAM's para T).

### **3.11 Inducción de la reacción acrosomal**

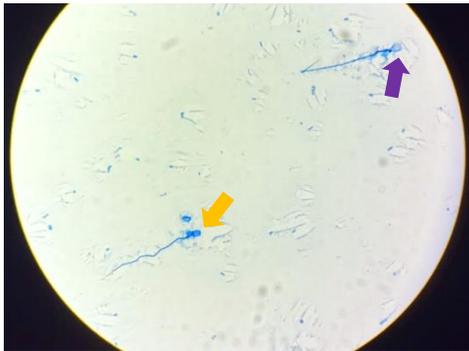
Una vez que los espermatozoides completaron el proceso de capacitación en ausencia o presencia de T o HC, se indujo la reacción acrosomal mediante Pg según el grupo experimental como se indicó anteriormente.

### **3.12 Reacción acrosomal teñida con Azul de Coomassie**

Las muestras de espermatozoides de los tratamiento 1-4 se fijaron con metanol para posteriormente centrifugar a 3500 rpm durante 4 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 400  $\mu$ l de PBS.

Se colocaron 50  $\mu$ l en cada portaobjeto y se extendió la muestra con ayuda de un cubreobjetos.

Se incubaron estas laminillas con la tinción de Azul de Coomassie durante 2 minutos, se eliminó el exceso con agua por la parte de atrás del portaobjetos y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente para observar en 100X (**Figura 19**).

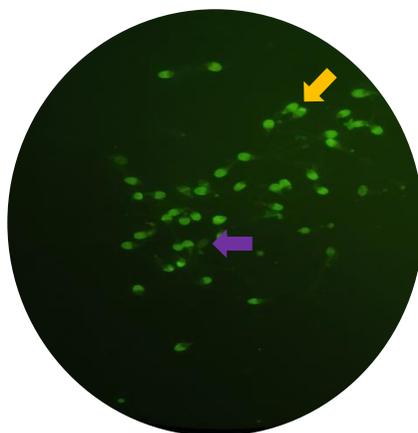


*Figura 20: Reacción acrosomal con Azul de Coomassie. Una coloración azul muy tenue en la zona del acrosoma se considera reaccionado (flecha morada). Cuando el espermatozoide presenta una coloración intensa en la cabeza se considera no reaccionado (flecha amarilla).*

### 3.13 Reacción acrosomal teñida con FITC-PSA

Una vez realizada la técnica de swim up, los espermatozoides se capacitaron de forma normal durante 3 horas. Después, se agregaron las hormonas (T o HC) durante 2 horas y finalmente, se adicionó Pg durante 1 hora.

Los espermatozoides se centrifugaron a 3500 rpm durante 4 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu$ l de metanol frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Luego, las muestras se colocaron en un vortex de 5 a 10 seg. Posteriormente, se colocaron en hielo durante 1 minuto, se resuspendieron y se colocaron 50  $\mu$ l de muestra en su respectivo portaobjetos colocándolos sobre una plancha a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se agregaron 20  $\mu$ l de *Pisum sativum* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (dil. 1:100, PBS-FITC-PSA, pH 7.4) y se hizo un barrido de la tinción con ayuda de un cubreobjetos (protegido de la luz). Los frotis se colocaron sobre una cámara húmeda durante 25 minutos. Se lavó el exceso de tinción con agua destilada y se dejaron secar y se evaluó el estado acrosómico de al menos 200 células empleando un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 100x y aceite de inmersión (**Figura 20**). Los resultados se expresaron como porcentajes del total de células evaluadas. Las células incubadas con el vehículo (DMSO) se emplearon como controles negativos y las células incubadas con 20  $\mu\text{M}$  de Pg se usaron como controles positivos.



**Figura 21: Reacción acrosomal con FITC-PSA.** Aquellos espermatozoides que no presentan fluorescencia en la cabeza son reaccionados (flecha morada) y aquellos que presentan fluorescencia en el segmento ecuatorial o en la cabeza se consideran no reaccionados (flecha amarilla).

### 3.14 Pruebas estadísticas

Se realizó una estadística descriptiva de los datos obtenidos y se determinó la distribución de éstos mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Una vez obtenida la distribución, se emplearon las pruebas de comparación múltiple de ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis y posteriormente las pruebas post hoc de Tukey o Dunn. Los porcentajes de RA fueron normalizados; se tomó como 100% el valor más alto de RA.

Se trabajó con una  $p < 0.05$  y un índice de confianza del 95%.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism v6.01.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados de espermogramas

Se evaluaron 43 hombres con una edad promedio de  $24.31 \pm 4.78$ . En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos de los espermogramas realizados. Todos los participantes obtuvieron resultados dentro de los parámetros de calidad espermática establecidos en el manual de la OMS.

*Tabla 5: Resultados de espermogramas*

	Total (n=43)	T (n=14)	HC (n=29)
<b>Parámetros macroscópicos</b>			
• Abstinencia (días)	3.36 $\pm$ 1.49	3.14 $\pm$ 1.40	3.45 $\pm$ 1.54
• Color		Blanco opalescente	
• Volumen (ml)	2.48 $\pm$ 1.64	2.65 $\pm$ 1.75	2.41 $\pm$ 1.61
• pH	8.28 $\pm$ 0.50	8.21 $\pm$ 0.57	8.31 $\pm$ 0.47
• Viscosidad (cm)		$\leq 2$	
<b>Parámetros microscópicos</b>			
• Concentración espermática (millones/ml)	129.9 $\pm$ 114.4	106.9 $\pm$ 94.56	139.0 $\pm$ 121.4
• Motilidad progresiva (%)	66.91 $\pm$ 15.75	61.75 $\pm$ 18.37	68.97 $\pm$ 14.34
• Motilidad no progresiva (%)	13.94 $\pm$ 10.02	15.79 $\pm$ 10.29	13.20 $\pm$ 9.96
• Motilidad total (%)	80.85 $\pm$ 9.87	77.54 $\pm$ 14.51	82.17 $\pm$ 7.13
• Inmovilidad (%)	18.08 $\pm$ 9.80	20.11 $\pm$ 14.38	17.27 $\pm$ 7.36
<b>Parámetros morfológicos</b>			
• Morfología normal	9.5%	8%	11%

Resultados de espermogramas expresados en promedio $\pm$ SD.

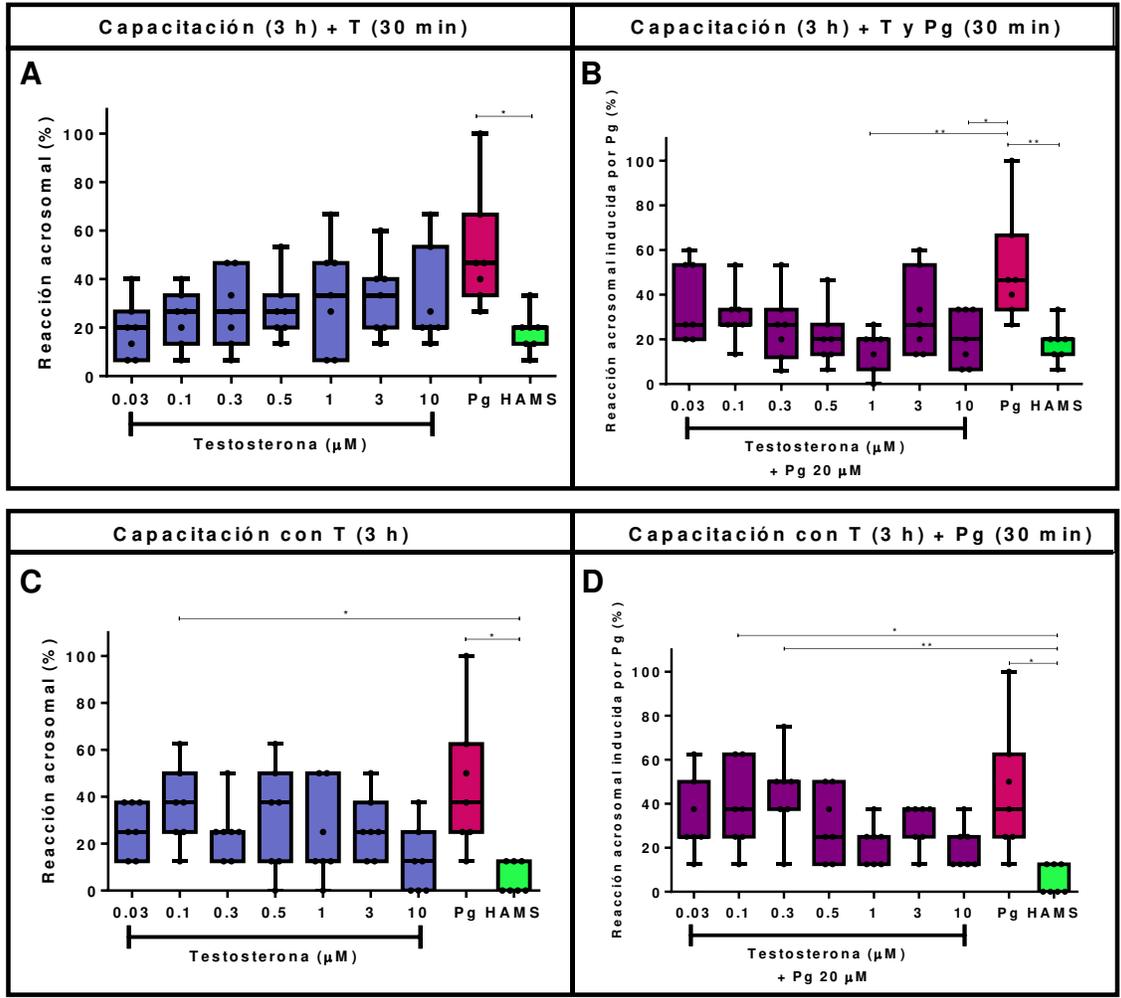
## 4.2 Resultados de reacción acrosomal con Azul de Coomassie

### 6.2.1. Testosterona

Con la finalidad de explorar el efecto de la T sobre la reacción acrosomal, las muestras de cada donador fueron divididas en dos experimentos; uno en el que se incubó la muestra únicamente con T para cuantificar reacción acrosomal espontánea y otro en donde se incubó en conjunto T y Pg para cuantificar reacción acrosomal inducida. Cada muestra incluyó un control positivo y un control negativo empleando Pg 20  $\mu\text{M}$  y medio HAM's suplementado, respectivamente.

En aquellas muestras capacitadas durante 3h y posteriormente incubadas 30 min con T, no se encontró ninguna diferencia significativa en los porcentajes de RA entre las diferentes concentraciones de T (**Figura 22A**). Sin embargo, en las muestras capacitadas durante 3h que posteriormente fueron incubadas en presencia de T y Pg durante 30 min, se observaron diferencias significativas en los porcentajes de RA entre 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) y 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) con respecto al control positivo (**Figura 22B**).

Se realizaron experimentos adicionales para observar si los porcentajes de RA cambiaban si las células espermáticas se capacitaban en presencia de T y observamos una diferencia significativa entre el porcentaje de RA espontánea empleando una concentración de T de 0.1  $\mu\text{M}$  comparada con el control negativo ( $p < 0.05$ ) (**Figura 22C**). Similar a lo que ocurre en los experimentos anteriores, a bajas concentraciones de T (0.03  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$  y 0.3  $\mu\text{M}$ ), la RA inducida por Pg aumenta y a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  la RA disminuye cuando las células espermáticas se capacitan en presencia de T y Pg (**Figura 22D**).



**Figura 22: La T inhibe la RA inducida por Pg en concentraciones a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  en espermatozoide humano.** Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas en ausencia y presencia de testosterona. A) RA observada en células espermáticas capacitadas durante 3h y luego incubadas con diferentes concentraciones de T durante 30 min. B) RA inducida por Pg 20  $\mu\text{M}$  observada en células espermáticas capacitadas durante 3h y luego incubadas con diferentes concentraciones de T y Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min. C) RA espontánea en células espermáticas capacitadas en presencia de diferentes concentraciones de T durante 3h. D) RA inducida por Pg en células espermáticas capacitadas en presencia de diferentes concentraciones de T durante 3h y posteriormente incubadas con Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min. (n donadores= 14; n muestras=28). Los valores fueron normalizados tomando en cuenta el valor más alto del control positivo (Pg). Comparaciones múltiples analizadas con ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis y pruebas post hoc de Tukey o Dunn, respectivamente. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

**Tabla 6: Promedios de RA espontánea e inducida generadas por diferentes concentraciones de T en células espermáticas.**

Concentración de T ( $\mu\text{M}$ )	RA espontánea: Capacitación (3 h) + T (30 min) (%)	RA inducida: Capacitación (3 h) + T y Pg (30 min) (%)	RA espontánea: Capacitación con T (3 h) (%)	RA inducida: Capacitación con T (3 h) + Pg (30 min) (%)
0.03	19.01	37.11	26.79	33.93
0.1	23.77	30.43	35.71	37.50
0.3	27.57	25.40	25	44.64
0.5	27.59	20.91	30.36	30.36
1	33.27	15.21	23.21	21.43
3	32.37	31.40	26.79	30.36
10	31.40	20.91	12.50	19.64

**Tabla 7: RA neta generada por diferentes concentraciones de T en células espermáticas.**

Concentración de T ( $\mu\text{M}$ )	RA neta = RA inducida - RA espontánea	
	Capacitación (3 h) + T y Pg (30 min) - Capacitación (3 h) + T (30 min) (%)	Capacitación con T (3 h) + Pg (30 min) - Capacitación con T (3 h) (%)
0.03	18.10	7.14
0.1	6.66	1.79
0.3	-2.17	19.64
0.5	-6.67	0
1	-18.06	-1.79
3	-0.97	3.57
10	-10.49	7.14

Mediante estos experimentos se observó que la T por sí sola es capaz de inducir RA (espontánea) Cuando las células espermáticas son capacitadas de forma normal durante 3 h y posteriormente se agrega T durante 30 min, el porcentaje de RA espontánea tiende a aumentar a medida que la concentración de T es mayor. Además, en la **Tabla 6** se observa que cuando las células espermáticas son capacitadas de forma normal durante 3 h y posteriormente se incuban con T y Pg durante 30 min, la RA inducida por Pg es menor que la RA espontánea a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  de T; es decir, la RA neta muestra valores negativos a partir de dicha concentración (**Tabla 7**).

En la **Tabla 6** se muestran los porcentajes de RA espontánea generados cuando los espermatozoides son capacitados en presencia de T durante 3 h y se observó que en algunas concentraciones (0.03, 0.01 y 0.5  $\mu\text{M}$ ), la RA espontánea llega incluso a ser mayor en comparación de las células espermáticas cuando son capacitadas de forma normal. Estos resultados indican que cuando los

espermatozoides son capacitados con T, hay una tendencia en donde la RA inducida por Pg es mayor que la RA espontánea (RA neta mostrada en **Tabla 7**).

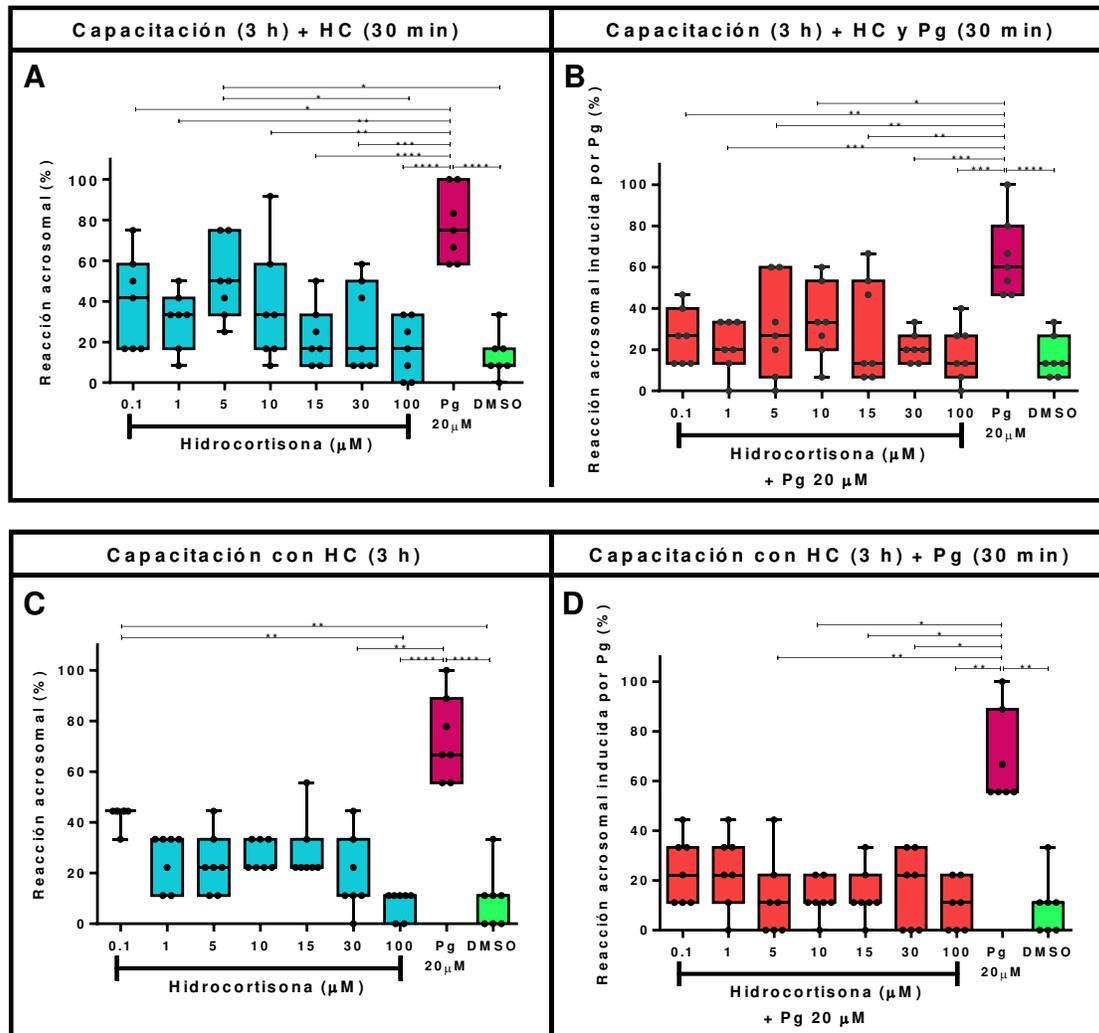
### 6.2.2. Hidrocortisona

Actualmente no existe evidencia acerca de la relación entre el efecto de la HC y la RA en el espermatozoide humano. Para explorar cómo es que esta hormona puede llegar a afectar los procesos de infertilidad, se realizaron diferentes experimentos con variaciones en el proceso de capacitación y en el tiempo de incubación.

En espermatozoides capacitados durante 3h e incubados subsecuentemente con diferentes concentraciones de HC durante 30 min, se observó que esta hormona es capaz de inducir por sí sola la RA; particularmente a concentraciones bajas (0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ). Aparentemente, cuando las células espermáticas son expuestas a concentraciones mayores de HC (15, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ), hay una tendencia a que los porcentajes de RA disminuyen. Sin embargo, a pesar de que la HC puede inducir RA por sí sola, se puede observar que estos porcentajes son significativamente menores a aquellos obtenidos cuando se induce la RA por Pg (**Figura 23A**).

En el segundo conjunto de experimentos, las células espermáticas fueron capacitadas durante 3h y luego incubadas con HC y Pg al mismo tiempo durante 30 min. Nuestros resultados indican que los porcentajes de RA fueron significativamente menores en todas las concentraciones empleadas comparadas con la Pg (**Figura 23B**).

Para explorar si la HC afecta la RA dependiendo del tiempo de incubación, se llevaron a cabo dos experimentos en donde las células espermáticas fueron capacitadas en presencia de HC durante 3h. Dentro de nuestros resultados, encontramos que concentraciones de 0.1, 1, 5, 10 y 30  $\mu\text{M}$  de HC fueron capaces de inducir RA (**Figura 23C**). Finalmente, cuando las células espermáticas fueron capacitadas con HC durante 3h y luego estimuladas con Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min, observamos que las diferentes concentraciones de HC inhibieron la RA inducida por Pg (**Figura 23D**).



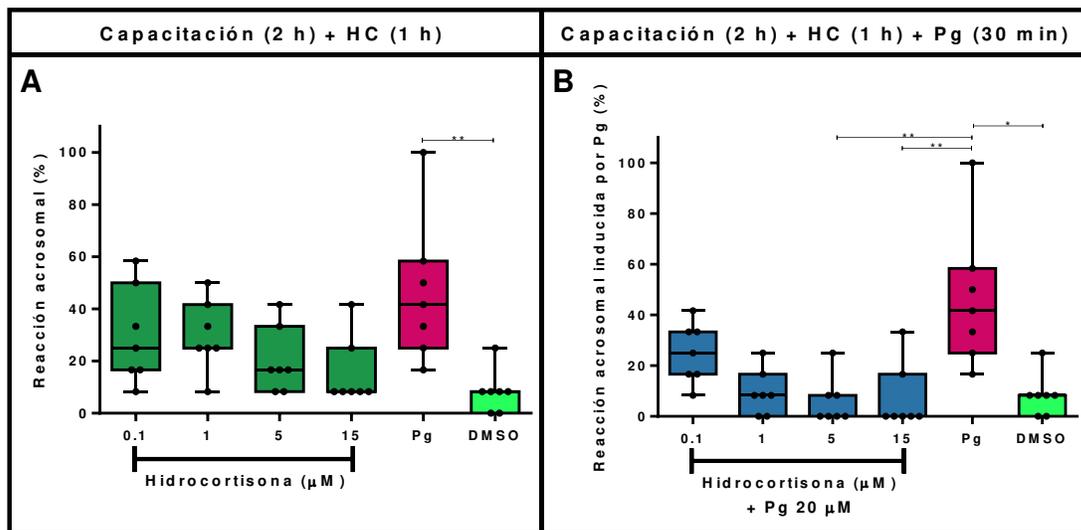
**Figura 23: La HC inhibe la RA inducida por Pg en el espermatozoide humano.** Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas en ausencia y presencia de hidrocortisona. A) RA observada en células espermáticas capacitadas durante 3h y luego incubadas con diferentes concentraciones de HC durante 30 min. B) RA inducida por Pg 20  $\mu\text{M}$  observada en células espermáticas capacitadas durante 3h y luego incubadas con diferentes concentraciones de HC y Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min. C) RA observada en células espermáticas capacitadas en presencia de diferentes concentraciones de HC durante 3h. D) RA inducida por Pg en células espermáticas capacitadas en presencia de diferentes concentraciones de HC durante 3h y posteriormente incubadas con Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min. ( $n$  donadores= 17;  $n$  muestras=34). Comparaciones múltiples analizadas con ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis y pruebas post hoc de Tukey o Dunn, respectivamente. \*\*\*\* $p$ <0.0001, \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05.

### 4.3 Resultados de reacción acrosomal con FITC-PSA

#### 4.3.1 Hidrocortisona

Finalmente, se realizaron experimentos con la técnica de FITC-PSA con el objetivo de determinar la integridad del acrosoma y obtener los porcentajes de RA. En esta

serie de experimentos, las muestras fueron capacitadas durante 2h y posteriormente se incubaron con HC (0.1, 1, 5 y 15  $\mu\text{M}$ ) durante 1h ya que, de acuerdo con experimentos previos que se realizaron, en estas 4 concentraciones se presentaron mayores cambios en los porcentajes de RA. A pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativas, observamos resultados similares a los anteriores; la HC es capaz de inducir mayor RA a bajas concentraciones (0.1, 1  $\mu\text{M}$ ) incluso si el tiempo de capacitación es menor y la exposición a HC es mayor (**Figura 23A**). Interesantemente, nuestros hallazgos indican que cuando las células espermáticas son capacitadas durante 2h, incubadas con HC durante 1h y posteriormente estimuladas con Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min, la RA se ve inhibida incluso a bajas concentraciones. Dentro de estos resultados se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) y 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) con respecto al control positivo (**Figura 2B**).



**Figura 24: La HC inhibe la RA inducida por Pg en espermatozoide humano. Porcentajes de RA espontánea e inducida por Pg en muestras capacitadas durante 2h y luego incubadas con HC 1h.** A) RA observada en células espermáticas capacitadas durante 2h y luego incubadas con diferentes concentraciones de HC durante 1h. B) RA inducida por Pg 20  $\mu\text{M}$  observada en células espermáticas capacitadas durante 2h y luego incubadas con diferentes concentraciones de HC durante 1h y finalmente estimuladas con Pg 20  $\mu\text{M}$  durante 30 min. (n donadores= 7; n muestras=14). Comparaciones múltiples analizadas con ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis y pruebas post hoc de Tukey o Dunn, respectivamente. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

## 5. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en aportar evidencia acerca del efecto de la T y la HC sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano. Los mecanismos moleculares de la RA no han sido dilucidados aún; sin embargo se sabe que este proceso depende de la activación del canal CatSper (Lishko et al., 2011; Rahban & Nef, 2020; X. Sun et al., 2017; Tamburrino et al., 2014) el cual permite un incremento en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  promoviendo la fusión de las membranas externas y acrosomal del espermatozoide (Bhongade et al., 2015; Mata-Martínez et al., 2018).

Nuestros hallazgos indican que la T por sí sola es capaz de inducir RA, aunque los porcentajes sean menores de acuerdo con el control positivo. Además, observamos que cuando los espermatozoides son capacitados durante 3 h y luego incubados en presencia de T y Pg durante 30 min, el porcentaje de RA inducida por Pg es mayor únicamente a bajas concentraciones de T (0.03 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) en donde hay un porcentaje de RA neta de 18.10% y 6.66%, respectivamente.

Según diversos reportes, las concentraciones de T en el TGF oscila entre 0.009  $\mu\text{M}$  a 0.19  $\mu\text{M}$  (Costa et al., 2004; Masjedi et al., 2019; Yang et al., 2015) por lo cual en estas concentraciones se podría reflejar un ambiente fisiológico en donde la T se encuentra dentro de parámetros normales sin interferir con la Pg de tal manera que esta última pueda ejercer su función como inductor fisiológico de la reacción acrosomal (Lishko et al., 2011; Mannowetz et al., 2017).

En cambio, a concentraciones mayores de T (0.3, 0.5, 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$ ), se observó que los porcentajes de RA inducida por Pg son menores que la RA espontánea generada por T. Según estos datos obtenidos, si el espermatozoide se incubaba con ambas hormonas juntas, la T tendría mayor capacidad para producir RA en comparación con la que podría inducir la Pg. Esto da pie a diversas preguntas: Si el espermatozoide previamente capacitado se encuentra expuesto a T y Pg al mismo tiempo, ¿la T a concentraciones mayores de 0.3  $\mu\text{M}$  tiene mayor afinidad por algún canal del espermatozoide que desencadene una cascada de señalización para producir la RA? Una de las hipótesis indica que la T puede unirse con mayor afinidad

al dominio ABHD2 causando la inhibición de CatSper, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por lo tanto, de la RA (Mannowetz et al., 2017).

En el caso de los hombres, se ha propuesto que el efecto inhibitorio de la T puede ser para prevenir una RA prematura (Mannowetz et al., 2017; Vigil et al., 2011); es decir, tiene un papel anti-capacitante (Lishko & Mannowetz, 2018a). Empleando una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , Mannowetz et al reportaron que la T inhibe las corrientes generadas por CatSper. Considerando que a mayor calcio intracelular mediado por CatSper hay mayor RA, dentro de nuestros resultados obtuvimos lo contrario, ya que cuando las células espermáticas fueron capacitadas durante 3 h y luego expuestas a concentraciones de T entre 0.3  $\mu\text{M}$  hasta 10  $\mu\text{M}$ , dicha hormona por sí sola induce la RA.

Actualmente sólo existe 1 estudio realizado en 2011 por Vigil y col. en donde investigaron el efecto de la T en la RA del espermatozoide humano (Vigil et al., 2011). Evaluaron diferentes tiempos (60, 120, 240 y 1440 min) con diferentes concentraciones de esta hormona (0.2, 2 y 20 nM) e incluyeron como control positivo Pg 10.1  $\mu\text{M}$ . En este estudio, reportaron que los espermatozoides incubados únicamente con Pg fueron aquellos que presentaron un mayor porcentaje de RA. Observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 3 tratamientos con respecto únicamente al control positivo después de 24 horas en donde dichos tratamientos tuvieron un efecto inhibitorio sobre la RA. Sin embargo, una limitante de este estudio es que no se incubaron las muestras en presencia de ambas hormonas (T+Pg).

Opuesto a estos resultados obtenidos por Vigil y col., de acuerdo con lo que reportó Prajapati y col. en 2022, la exposición de las células espermáticas capacitadas durante 3 h y luego expuestas a Pg 10  $\mu\text{M}$  desde 30 min hasta 60 min no aumenta de forma significativa la RA; sin embargo, en algunos casos se presentó un aumento mayor a 2 veces. Estos autores afirmaron que la Pg no fue eficaz en inducir incremento de RA incluso extendiendo el período de incubación hasta 1 h con Pg (Prajapati et al., 2022). Estos experimentos coinciden con los nuestros en cuanto a que la Pg no causó un aumento de la RA en espermatozoides previamente capacitados durante 3h.

De forma contraria, se observó en estos experimentos que cuando las células espermáticas se capacitan en presencia de T durante 3 h y luego se añade Pg durante 30 min, si bien, la T induce RA de forma espontánea, la RA inducida por Pg es mayor en casi la totalidad de las concentraciones probadas (excepto en 1  $\mu\text{M}$  que presentó un porcentaje de RA espontánea mayor que la inducida por Pg).

Tomando en consideración nuestros resultados y tomando en cuenta que la capacitación espermática ocurre en el TGF, ¿por qué la Pg es capaz de inducir RA en un espermatozoide capacitado en presencia de T pero no en uno capacitado de forma normal?

En el caso de las mujeres, cuando la T se encuentra en altas concentraciones; por ejemplo, en aquellas que presentan síndrome de ovario poliquístico, se genera infertilidad en aproximadamente el 50% de las mujeres que lo presentan. Por ello, niveles elevados de T en mujeres, pueden afectar la función de CatSper; esto produciría alteraciones en la capacitación del espermatozoide (Lishko & Mannowetz, 2018a) ya que no habría aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y se bloquearía la vía de señalización de la ACs-AMPC-PKA-PKT, inhibiéndose la fosforilación de proteínas la cual permitiría la apertura de los GLUTs encargados de ingresar glucosa a la célula espermática la cual es útil para la generación de ATP brindando energía al espermatozoide para que presente una hiperactivación flagelar (Naresh & Atreja, 2015). En caso que lo anterior ocurra, causaría un deterioro en el avance del espermatozoide hacia el sitio de fertilización (Lishko & Mannowetz, 2018a).

Si pudiéramos en un contexto clínico nuestros resultados, esto querría decir que cuando una mujer tiene altas concentraciones de T, los espermatozoides que se encuentren en el TGF pueden capacitarse en presencia de T y luego gracias a la Pg, llevar a cabo el proceso de RA.

Algunas posibles explicaciones podrían ser las siguientes: 1) en mujeres con altas concentraciones de T, esta hormona incrementa la RA espontánea para prevenir la fertilización del óvulo, 2) hay una competencia entre la T y Pg y dado que en el TGF hay mayor Pg, por eso hay incremento de RA inducida por Pg; dentro de nuestros resultados se observa que hay una tendencia a que la RA espontánea generada por

T es menor a mayores concentraciones de T, 3) la T es un modulador endócrino que depende de diversos factores como alimentación, estilo de vida, herencia, etc. Actualmente no existen estudios que hayan determinado los porcentajes de RA producidos por T, sin embargo, los cambios en las  $[Ca^{2+}]_i$  son vitales para que la RA ocurra (Prajapati et al., 2022). Según un estudio publicado recientemente, se encontró que la T tiene una potencia moderada para provocar la absorción de calcio en el espermatozoide la cual presenta de 120 a 150 veces menos potencia que la Pg (Carlson et al., 2022).

Otro estudio publicado por Brenker y col. confirmaron lo siguiente: la T estimula el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de CatSper, la pre incubación con T no antagoniza las corrientes de CatSper inducidas por Pg ni tampoco el influjo de  $Ca^{2+}$  inducido por Pg (Brenker et al., 2018).

En otro estudio por medio de experimentos de fluorimetría, Rehfeld reportó que cuando los espermatozoides son sometidos a T se produce un aumento en las señales de  $Ca^{2+}$  y posteriormente cuando se agrega Pg, las señales se inhiben pero no se antagonizan por completo (Rehfeld, 2020) lo cual coincide con nuestros resultados de por qué la Pg puede inducir RA cuando el espermatozoide fue previamente capacitado en presencia de T.

Sin embargo, en el estudio realizado por Prajapati, determinaron que para que exista una exocitosis acrosomal, se requiere que haya  $[Ca^{2+}]_i$  elevadas y sostenidas logradas por la alcalinización intracelular, Pg y PGE1, pero incluso con esto, las células que sufran RA varían en gran medida y no correlaciona con la respuesta a  $[Ca^{2+}]_i$ . De hecho, estos autores afirman que a pesar de la capacidad que tiene la Pg para incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$ , la eficacia para inducir RA es baja y no efectiva (Prajapati et al., 2022).

Con respecto a la HC, se sabe que aquellas personas que presentan estrés tienen mayores problemas para concebir. La infertilidad depende de diversos factores; desde causas médicas, ambientales, estilo de vida, etc. (Ramirez Moran et al., 2019). A nivel celular puede causar desde parámetros anormales en las células espermáticas en donde haya daño a las mitocondrias (Durairajanayagam et al.,

2021) hasta estrés oxidativo que lleve a fragmentación del ADN espermático (González-Marín et al., 2012), desequilibrios hormonales que lleven a cambios en las concentraciones de diversas hormonas como glucocorticoides, catecolaminas, hormona del crecimiento, etc. (Ranabir & Reetu, 2011).

Nuestros resultados indican que al igual que la T, la HC es capaz de inducir RA a bajas concentraciones (0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) aunque en porcentajes más bajos que aquellos inducidos con Pg; mientras que a mayores concentraciones (15, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ) se observó una tendencia de estos porcentajes a disminuir. De acuerdo con diversos estudios, las concentraciones fisiológicas de cortisol en la mujer en el TGF van desde 0.07  $\mu\text{M}$  hasta 0.21  $\mu\text{M}$  (Andersen, 2002; Fateh et al., 1989; Jimena et al., 1992; Lewicka et al., 2003; Mantzavinos et al., 1997). Hasta donde se tiene conocimiento, no hay ningún estudio que haya reportado la concentración de cortisol en mujeres que presenten estrés, sin embargo es bien sabido que las mujeres sometidas a tratamientos de fecundación in vitro tienen altos niveles de estrés y se han determinado valores de cortisol en estas pacientes que van desde 0.287 hasta 0.574  $\mu\text{M}$  (Jimena et al., 1992) las cuales son bastante similares a lo que se ha encontrado en mujeres de grupos control.

Dado el estilo que se lleva actualmente, es más probable que las células espermáticas se enfrenten a concentraciones de cortisol mayores a las fisiológicas tanto en hombres como en mujeres (Rooney & Domar, 2018).

De acuerdo con la Asociación Americana de Psicología, el estrés es una condición que puede afectar todos los sistemas del cuerpo incluyendo el musculoesquelético, respiratorio, cardiovascular, endócrino, gastrointestinal, nervioso y reproductivo (American Psychiatric Association, 2018).

El cortisol es una hormona producida por el eje HPA que se libera en situaciones de estrés agudo y crónico la cual se ha documentado que es uno de los diversos factores que causa infertilidad (Rooney & Domar, 2018).

Nuestros experimentos son los primeros en poner en evidencia el efecto de distintas concentraciones de HC directamente sobre la RA. Por medio de estos demostramos que la HC por sí sola es capaz de inducir RA a bajas concentraciones (0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) ya que cuando las células espermáticas son sometidas a concentraciones

mayores (15, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ), la RA tiende a disminuir. Como se mencionó anteriormente, la RA es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en donde participa CatSper (Allgeyer et al., 2006; Baldi et al., 2009; Oettel & Mukhopadhyay, 2004). Dentro de nuestros resultados publicados recientemente, se realizaron mediciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en espermatozoides capacitados durante al menos 4 h; se utilizaron concentraciones desde 0.01 hasta 100  $\mu\text{M}$ . Estos resultados indicaron que la HC es capaz de producir movilización en las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dependiendo de la dosis; a mayor dosis, mayor movilización en las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Sánchez González et al., 2022). Esto coincide con los resultados obtenidos por Brenker y col. y con aquellos obtenido por Rehfeld los cuales también afirman que la HC induce señales de calcio dependiente de la dosis (Brenker et al., 2018; Rehfeld, 2020). Sin embargo, de acuerdo con lo obtenido en nuestros experimentos de RA, notamos que el efecto de HC sobre las corrientes de calcio y de RA es opuesto, ya que a mayores concentraciones de HC, hay menores porcentajes de RA, pero hay mayor movilización en las señales de calcio. Con respecto a eso, anteriormente se ha demostrado que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  juegan un papel importante en prevenir la RA (Mata-Martínez et al., 2018; Sánchez-Cárdenas et al., 2014). En este sentido, probablemente mayores concentraciones de HC podrían inducir oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y este comportamiento podría inhibir la RA. En nuestro estudio, obtuvimos una que la HC tiene una  $\text{EC}_{50}=7.8 \mu\text{M}$  mientras que Rehfeld reportó que la HC tiene una  $\text{EC}_{50}=12.45 \mu\text{M}$  en espermatozoides humanos capacitados por al menos 1 h (Rehfeld, 2020) y Brenker y col. observaron que la HC tiene una  $\text{EC}_{50}=11.4 \mu\text{M}$  y que la HC produce un aumento en las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en espermatozoides humanos no capacitados (Brenker et al., 2018) lo cual puede ser atribuido a diferencias en los tratamientos de las muestras (Sánchez González et al., 2022).

Además, se observó que las respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producidas por Pg cuando las células espermáticas son previamente expuestas a HC en concentraciones mayores de 15  $\mu\text{M}$  se ven inhibidas ( $\text{IC}_{50}=6.8 \mu\text{M}$ ) (Sánchez González et al., 2022). Esto podría indicar una interacción entre los receptores de HC y Pg, generando un efecto dual dependiendo de la concentración. A pesar de que no medimos directamente la actividad de CatSper, de acuerdo con los experimentos de Rehfeld,

se demostró que CatSper es responsable por estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que podemos inferir que estas señales de calcio determinadas son debidas a CatSper (Sánchez González et al., 2022).

Se observó que cuando las células espermáticas se incuban en presencia de HC y Pg durante 30 min, los porcentajes de RA disminuyen significativamente en comparación con la Pg en todas las concentraciones empleadas en estos experimentos. Esto podría reafirmar los resultados de experimentos previos que confirman que ambas hormonas podrían estar compitiendo por el mismo sitio activo llamado proteína 2 contenedora del dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa (ABHD2). La Pg es capaz de unirse a este dominio y una vez que esto ocurre, se elimina mediante hidrólisis el 2-araquidonoilglicerol (2AG) (un inhibidor de CatSper); el cual una vez removido, CatSper adquiere su función promoviendo procesos como quimiotaxis, capacitación y RA (Lishko & Mannowetz, 2018b).

Empleando una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de HC, otro estudio reportó que esta hormona inhibe la activación de CatSper por Pg (Mannowetz et al., 2017) ya que los efectos fueron muy notorios con una inhibición significativa de las corrientes generadas por el canal ( $\text{IC}_{50}=0.152 \mu\text{M}$ ); es decir, que la HC tiene un papel antagonista sobre CatSper (Mannowetz et al., 2017). Por el contrario, otro estudio reportó una  $\text{IC}_{50}=17.29 \mu\text{M}$  afirmando que la HC juega un papel agonista sobre CatSper pero que su efecto es dosis-dependiente (Brenker et al., 2018; Rehfeld, 2020). Con respecto a nuestro estudio, nuestros resultados coinciden tanto con los reportados por Mannowetz, así como los reportados por Brenker y Rehfeld ya que la HC juega un papel antagonista como agonista, respectivamente.

Estos hallazgos se respaldan parcialmente en que clínicamente, algunas condiciones como el estrés y el incremento de glucocorticoides como el cortisol (HC) pueden provocar problemas de infertilidad; ya sea por la inhibición de la espermatogénesis o un conteo reducido del número o movilidad en los espermatozoides o en el caso de la mujer se puede llegar a afectar el potencial de fecundación de los espermatozoides (durante la capacitación y RA) (los cuales tienen lugar en el tracto genital femenino (Mannowetz et al., 2017). Sin embargo, queda pendiente por responder preguntas como: ¿Por qué la HC inhibe la RA

inducida por Pg? De acuerdo con nuestros resultados, cuando las células espermáticas son capacitadas con HC durante 3h y luego estimuladas con Pg 20  $\mu$ M durante 30 min, observamos que las diferentes concentraciones de HC inhibieron la RA inducida por Pg; probablemente también las altas concentraciones de HC tengan un rol anti-capacitante y quizás, la RA espontánea ocurra para impedir que haya una fertilización.

## 6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que la T e HC presentan un efecto modulador.

La T es capaz de inducir RA por sí sola y aparentemente, es capaz de inducir mayor RA que la Pg cuando el espermatozoide se encuentra en presencia de ambas.

La HC igualmente es capaz de inducir RA dependiendo de la dosis empleada; a mayor concentración de HC, hay menor porcentaje de RA. Además, la HC disminuye la RA inducida por Pg.

Actualmente los mecanismos moleculares de cómo estas hormonas promueven/inhiben la RA no han sido dilucidados. Sin embargo, gracias a esta investigación, se propone que estas dos hormonas podrían ser importantes moduladores sobre la RA y es importante que, en futuros estudios, se tomen en cuenta otros factores como la alimentación y el estilo de vida para poder discernir si estos influyen en que el espermatozoide atraviese por la RA.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allais-Bonnet, A., & Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2, 56. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00056>
- Allgeyer, M., Kirschenhofer, N., Mann, U., & Brucker, C. (2006). Measurement of induced acrosome reactions in human sperm using physiologic stimuli—Relevance for the prediction of fertilization outcome. *Andrologia*, 38(3), 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2006.00722.x>
- Almeida, R. G., Faria, F. J., Furtado, F. H., Santos, E. F., & Costa, D. S. (2018). Characterization of Testicular Angiotensin-Converting Enzyme before and after Semen Cryopreservation and in the Acrosome Reaction of Spermatozoids of Nelore Bulls. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/332499979\\_Characterization\\_of\\_Testicular\\_Angiotensin-Converting\\_Enzyme\\_before\\_and\\_after\\_Semen\\_Cryopreservation\\_and\\_in\\_the\\_Acrosome\\_Reaction\\_of\\_Spermatozoids\\_of\\_Nelore\\_Bulls](https://www.researchgate.net/publication/332499979_Characterization_of_Testicular_Angiotensin-Converting_Enzyme_before_and_after_Semen_Cryopreservation_and_in_the_Acrosome_Reaction_of_Spermatozoids_of_Nelore_Bulls)
- American Psychiatric Association. (2018). *Stress effects on the body*. <https://www.apa.org>. <https://www.apa.org/topics/stress/body>
- AMMR. (2020). *Situación de la infertilidad en México*. <https://ammr.org.mx/situacion-de-la-infertilidad-en-mexico/>
- Ananya Mandal. (2019). *Fisiología del semen*.
- Andersen, C. Y. (2002). Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: Physiological implications of the free hormone hypothesis. *The Journal of Endocrinology*, 173(2), 211–217. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1730211>

- Avidor-Reiss, T., Mazur, M., Fishman, E. L., & Sindhvani, P. (2019). The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction—The Known and the Unknown. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 188. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00188>
- Ayaz, O., & Howlett, E. (2015). Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: Cellular and molecular mechanisms. *Biology of Sex Differences*.  
[https://www.researchgate.net/publication/275661621\\_Testosterone\\_modulates\\_cardiac\\_contraction\\_and\\_calcium\\_homeostasis\\_Cellular\\_and\\_molecular\\_mechanisms](https://www.researchgate.net/publication/275661621_Testosterone_modulates_cardiac_contraction_and_calcium_homeostasis_Cellular_and_molecular_mechanisms)
- Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., & Forti, G. (2009). Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.006>
- Barati, E., Nikzad, H., & Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: Current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(1), 93–113.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
- Bhongade, M. B., Prasad, S., Jiloha, R. C., Ray, P. C., Mohapatra, S., & Koner, B. C. (2015). Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia*, 47(3), 336–342. <https://doi.org/10.1111/and.12268>
- Bio-Imaging Systems. (2020). *Coomassie Brilliant Blue*.
- Blair, J., Adaway, J., Keevil, B., & Ross, R. (2017). Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 24(3), 161–168.  
<https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000328>
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2012). The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO Journal*, 31(7), 1654–1665. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.30>

- Brenker, C., Schiffer, C., Wagner, I. V., Tüttelmann, F., Röpke, A., Rennhack, A., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2018). Action of steroids and plant triterpenoids on CatSper Ca<sup>2+</sup> channels in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(3), E344–E346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717929115>
- Brum, A. M., Thomas, A. D., Sabeur, K., & Ball, B. A. (2006). Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, *67*(2), 358–362. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.2.358>
- Cardona, W. D., Olivera, M., & Cadavid, Á. P. (2006). *Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: Una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide.*
- Carlson, E. J., Georg, G. I., & Hawkinson, J. E. (2022). Steroidal Antagonists of Progesterone- and Prostaglandin E1-Induced Activation of the Cation Channel of Sperm. *Molecular Pharmacology*, *101*(1), 56–67. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000349>
- Celeghini, E. C. C., Nascimento, C. F., Raphael, A. F. C., & Andrade, R. P. (2010). *Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes.* [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352010000300006](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000300006)
- Chemes, H. E. (2017, mayo). *Sperm Ultrastructure in Fertile Men and Male Sterility.* The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration; Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316411124.005>
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, *13*(1), 130–138. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>
- Costa, L. O. B., Mendes, M. C., Ferriani, R. A., Moura, M. D., Reis, R. M., & Silva de Sá, M. F. (2004). Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate

between mature and immature oocytes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 37(11), 1747–1755.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001100021>

Cox, J. F., Fernandez, P., Saravia, F., & Santa Maria, A. (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 30(1), 93–99.  
<https://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000100010>

Darren J Katz, Patrick Teloken, & Ohad Shoshany. (2017). Male infertility—The other side of the equation. *ResearchGate*.  
[https://www.researchgate.net/publication/319798031\\_Male\\_infertility\\_-\\_The\\_other\\_side\\_of\\_the\\_equation](https://www.researchgate.net/publication/319798031_Male_infertility_-_The_other_side_of_the_equation)

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305–1355.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>

Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*, 53(1), e13666.  
<https://doi.org/10.1111/and.13666>

Eddy, E. M., Toshimori, K., & O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 61(1), 103–115. <https://doi.org/10.1002/jemt.10320>

EMD Millipore Corporation. (2017). *Fluoresceína 5-isotiocianato (FITC)*.

Espinosa, P. S., Boix, S. T., Huerta-Retamal, N., Sánchez, M. A., Aizpurua, J., Rameta, A. R., & Gómez-Torres, M. J. (2018). La capacitación y la reacción acrosómica se asocian con cambios en la localización del ácido siálico y en la morfometría de la región cefálica del

- espermatozoide humano. *Revista internacional de Andrología: salud sexual y reproductiva*, 16(1), 20–27.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L. A., van Duin, M., Conti, M., Gossen, J. A., & Jaiswal, B. S. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2993–2998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400050101>
- Fateh, M., Ben-Rafael, Z., Benadiva, C. A., Mastroianni, L., & Flickinger, G. L. (1989). Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertility and Sterility*, 51(3), 538–541. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)60572-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)60572-1)
- Fernando Vásquez R, D. V. E. (2007). *Espermograma y su utilidad clínica*. <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/4037/5726>
- Fuentes, A., Sequeira, K., Tapia-Pizarro, A., Muñoz, A., Salinas, A., Céspedes, P., Escalona, J., & Godoy, A. (2019). Androgens Profile in Blood Serum and Follicular Fluid of Women With Poor Ovarian Response During Controlled Ovarian Stimulation Reveals Differences Amongst POSEIDON Stratification Groups: A Pilot Study. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 458. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00458>
- Gadella, B. M. (2010). Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 67, 267–287. <https://doi.org/10.7313/upo9781907284991.023>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>

- Gil, M., & Martínez, J. M. (2010). *Síndrome de déficit de testosterona y disfunción eréctil*.  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06142010000800012](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06142010000800012)
- Giuliano, S. M., & Fumuso, F. (2015). Evaluación del estado acrosomal en espermatozoides de llama. *ResearchGate*.  
[https://www.researchgate.net/publication/292966304\\_Evaluacion\\_del\\_estado\\_acrosoma\\_l\\_en\\_espermatozoides\\_de\\_llama\\_EVALUATION\\_OF\\_ACROSOMAL\\_STATUS\\_ON\\_LLAMA\\_SPERM\\_Maria\\_Ignacia\\_Carretero\\_Fernanda\\_Gabriela\\_Fumuso\\_Marcelo\\_Miragaya\\_Susana\\_Maria\\_Giuliano\\_-\\_Sper](https://www.researchgate.net/publication/292966304_Evaluacion_del_estado_acrosoma_l_en_espermatozoides_de_llama_EVALUATION_OF_ACROSOMAL_STATUS_ON_LLAMA_SPERM_Maria_Ignacia_Carretero_Fernanda_Gabriela_Fumuso_Marcelo_Miragaya_Susana_Maria_Giuliano_-_Sper)
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14026–14052. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
- Guerrero, J. (2017). Para entender la acción de cortisol en inflamación aguda: Una mirada desde la glándula suprarrenal hasta la célula blanco. *Revista médica de Chile*, 145(2), 230–239.  
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872017000200011>
- Han, F., Liu, C., Zhang, L., Chen, M., Zhou, Y., Qin, Y., Wang, Y., Chen, M., Duo, S., Cui, X., Bao, S., & Gao, F. (2017). Globozoospermia and lack of acrosome formation in GM130-deficient mice. *Cell Death & Disease*, 8(1), e2532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.414>
- Hossain, F. M., Hong, Y., Jin, Y., Choi, J., & Hong, Y. (2019). Physiological and Pathological Role of Circadian Hormones in Osteoarthritis: Dose-Dependent or Time-Dependent? *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/jcm8091415>
- I. Huhtaniemi. (2010). *¿Cómo se leen las señales hormonales en el sistema reproductor masculino?* Manual de Andrología.

- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization: A sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(4), 984–994.  
<https://doi.org/10.1172/JCI41585>
- interchim. (2022, abril 13). *Coomassie Blue (R-250, G-250)*. PDF4PRO.  
<https://pdf4pro.com/view/coomassie-blue-r-250-g-250-7867dd.html>
- Jeschke, J. K., Biagioni, C., Schierling, T., Wagner, I. V., Börgel, F., Schepmann, D., Schüring, A., Kulle, A. E., Holterhus, P. M., von Wolff, M., Wünsch, B., Nordhoff, V., Strünker, T., & Brenker, C. (2021). The Action of Reproductive Fluids and Contained Steroids, Prostaglandins, and Zn<sup>2+</sup> on CatSper Ca<sup>2+</sup> Channels in Human Sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 699554. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.699554>
- Jiang, Y., Zhuo, D., Chen, Y., Lin, Y., & Han, M. (1998, enero 1). *Evaluation of Coomassie brilliant blue staining for detection of human sperm acrosome reactio*. *Acta Anatomica Sinica*.
- Jimena, P., Castilla, J. A., Peran, F., Ramirez, J. P., Vergara, F., Molina, R., Vergara, F., & Herruzo, A. (1992). Adrenal hormones in human follicular fluid. *Acta Endocrinologica*, *127*(5), 403–406. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1270403>
- Jin, S.-K., & Yang, W.-X. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget*, *8*(2), 3600–3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- K.P. Roberts. (2010). *Cuáles son los componentes del sistema reproductor masculino? SNC, hipófisis, testículos, epidídimo, próstata, vesículas seminales, escroto, pene*.
- La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N., & Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology*, *411*(2), 172–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.006>

- Lamprou, P., Sarantaki, A., & Gourounti, K. (2021). Stress and Anxiety Levels in Couples who Undergo Fertility Treatment: A Review of Systematic Reviews. *Materia Socio-Medica*, 33(1), 60–64. <https://doi.org/10.5455/msm.2021.33.60-64>
- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development*, 52(4), 445–449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6)
- Lewicka, S., von Hagens, C., Hettinger, U., Grunwald, K., Vecsei, P., Runnebaum, B., & Rabe, T. (2003). Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(8), 1613–1617. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg352>
- Li, A., Zhang, L., Jiang, J., Yang, N., Liu, Y., Cai, L., Cui, Y., Diao, F., Han, X., Liu, J., & Sun, Y. (2018). Follicular hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome patients with normal circulating testosterone levels. *Journal of Biomedical Research*, 32(3), 208–214. <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170136>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), Art. 7338. <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 23), 4667–4672. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194142>
- Lishko, P. V., & Mannowetz, N. (2018a). CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. *Current Opinion in Physiology*, 2, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.02.004>

- Lishko, P. V., & Mannowetz, N. (2018b). CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. *Current Opinion in Physiology*, 2, 109–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.02.004>
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Bärfuss, A., Santi, C., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane Hyperpolarization during Human Sperm Capacitation. *Molecular human reproduction*, 20. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau029>
- Lotti, F., & Maggi, M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 15(5), 287–307. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.20>
- Luetjens, C. M., & Weinbauer, G. F. (2011). Testosterone: Biosynthesis, transport, metabolism and (non-genomic) actions. En *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution* (4th ed., pp. 65–79).  
[https://www.researchgate.net/publication/276889636\\_Testosterone\\_Biosynthesis\\_transport\\_metabolism\\_and\\_non-genomic\\_actions](https://www.researchgate.net/publication/276889636_Testosterone_Biosynthesis_transport_metabolism_and_non-genomic_actions)
- Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. (2017). Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), 5743–5748.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1700367114>
- Mantzavinos, T., Phocas, I., Vitoratos, N., Photopoulos, S., Hassiakos, D., & Antoniou, G. (1997). Comparison between steroid hormones and cortisol in serum and follicular fluid in stimulated and unstimulated cycles of in vitro fertilization patients. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 11(3), 163–168. <https://doi.org/10.3109/09513599709152530>

- Masjedi, F., Keshtgar, S., Agah, F., & Karbalaei, N. (2019). Association Between Sex Steroids and Oxidative Status with Vitamin D Levels in Follicular Fluid of Non-obese PCOS and Healthy Women. *Journal of Reproduction & Infertility*, *20*(3), 132–142.
- Mata-Martínez, E., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2018). PH-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *497*(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.042>
- Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: Relating ultrastructure and function. *Molecular Human Reproduction*, *24*(12), 567–592. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay040>
- Naresh, S., & Atreja, S. K. (2015). The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*, *70*(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2021a). *PubChem Compound Summary for CID 5754, Hydrocortisone*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5754>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2021b). *PubChem Compound Summary for CID 6013, Testosterone*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6013>
- Oettel, M., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Progesterone: The forgotten hormone in men? *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, *7*(3), 236–257. <https://doi.org/10.1080/13685530400004199>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *19*(4), 426–436.

- Olson, S. D., Fauci, L. J., & Suarez, S. S. (2011). Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Molecular Human Reproduction*, *17*(8), 500–510.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gar040>
- Pan, X., Wang, Z., Wu, X., Wen, S. W., & Liu, A. (2018). Salivary cortisol in post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, *18*.  
<https://doi.org/10.1186/s12888-018-1910-9>
- Patel, A. S., Leong, J. Y., Ramos, L., & Ramasamy, R. (2019). Testosterone Is a Contraceptive and Should Not Be Used in Men Who Desire Fertility. *The World Journal of Men's Health*, *37*(1), 45–54. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180036>
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *62*(5), 1380–1386.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1380>
- Prajapati, P., Kane, S., McBrinn, R. C., Dean, M. S., Martins da Silva, S. J., & Brown, S. G. (2022). Elevated and Sustained Intracellular Calcium Signalling Is Necessary for Efficacious Induction of the Human Sperm Acrosome Reaction. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11253. <https://doi.org/10.3390/ijms231911253>
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Rahban, R., & Nef, S. (2020). CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *518*, 110951.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110951>

- Ramirez Moran, A. F., Cala Bayeux, Á., Fajardo Iglesia, D., Scott Grave de Peralta, R., Ramirez Moran, A. F., Cala Bayeux, Á., Fajardo Iglesia, D., & Scott Grave de Peralta, R. (2019). Factores causales de infertilidad. *Revista Información Científica*, *98*(2), 283–293.
- Ranabir, S., & Reetu, K. (2011). Stress and hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *15*(1), 18–22. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.77573>
- Rehfeld, A. (2020). Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca<sup>2+</sup> channel CatSper. *Molecular Human Reproduction*, *26*(11), 816–824. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa062>
- Reproducción Asistida ORG. (2018). *¿Cómo se forman los espermatozoides? - Fases de la espermatogénesis.*
- Reproducción Asistida ORG. (2019). *¿Cómo es el espermatozoide? - Formación, partes y función.*
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, *154*, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.004>
- Rodrigo, A., Ortega, L., Gijón, L., & Trolice, M. (2019). *¿En qué consiste la capacitación de los espermatozoides?* Reproducción Asistida ORG.
- Romarowski, A. (2017). *Participación del citoesqueleto de actina y el calcio intracelular en el control de la exocitosis acrosomal espermática.*
- Rooney, K. L., & Domar, A. D. (2018). The relationship between stress and infertility. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *20*(1), 41–47.
- Ruiz, V. (2016). *¿Cuánto viven los espermatozoides?*
- Sánchez González, S. R., Mata Martínez, E., Torres Juárez, J. A., Arias, R. J., De Blas, G. A., & Sánchez Tusie, A. A. (2022). Cortisol modulates Ca<sup>2+</sup> signaling and acrosome reaction in human sperm. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13319>

- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca<sup>2+</sup> Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Biology of Reproduction*, *91*(3).  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119768>
- Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *94*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl051>
- Schwartz, M. F., Kolodny, R. C., & Masters, W. H. (1980). Plasma testosterone levels of sexually functional and dysfunctional men. *Archives of Sexual Behavior*, *9*(5), 355–366.  
<https://doi.org/10.1007/bf02115938>
- Sigma-Aldrich Co. (2018). *Coomassie Brilliant Blue Forms*.
- Simons, J., & Fauci, L. (2018). A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Bulletin of Mathematical Biology*, *80*(9), 2481–2501. <https://doi.org/10.1007/s11538-018-0478-3>
- Singh, A. P., & Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, *30*(1), 28–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.014>
- Starc, A., Trampuš, M., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Jukić, T., & Polona Mivšek, A. (2019). INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. *Acta Clinica Croatica*, *58*(3), 508–515. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.03.15>
- Sumigama, S., Mansell, S., Miller, M., Lishko, P. V., Cherr, G. N., Meyers, S. A., & Tollner, T. (2015). Progesterone Accelerates the Completion of Sperm Capacitation and Activates CatSper Channel in Spermatozoa from the Rhesus Macaque. *Biology of Reproduction*, *93*(6), 130.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129783>

- Sun, H., Gong, T.-T., Jiang, Y.-T., Zhang, S., Zhao, Y.-H., & Wu, Q.-J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: Results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*, *11*(23), 10952–10991. <https://doi.org/10.18632/aging.102497>
- Sun, X., Zhu, Y., Wang, L., Liu, H., Ling, Y., Li, Z., & Sun, L. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: A systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *15*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0281-2>
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M., & Baldi, E. (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: Relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *29*(3), 418–428. <https://doi.org/10.1093/humrep/det454>
- Thau, L., & Sharma, S. (2020). Physiology, Cortisol. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/>
- Thermo Fisher, Scientific. (2020). *Coomassie Brilliant Blue R-250 y G-250*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20278>
- Torres Fuentes, J. L. A. (2015). *Participación de los canales formados por pannexinas en la fisiología del espermatozoide de ratón*.
- Turner, K. A., Rambhatla, A., Schon, S., Agarwal, A., Krawetz, S. A., Dupree, J. M., & Avidor-Reiss, T. (2020). Male Infertility is a Women’s Health Issue—Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells*, *9*(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040990>
- Vallvé, J. de M. (2017). *CASA, análisis de semen automatizado: Aplicabilidad y tendencias de futuro*. 30.

- Vigil, P., Barrientos, V. M., Vargas, G. G., Machuca, D. A., & Cortés, M. E. (2012). Assessment of the effect of testosterone on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Andrologia*, *44 Suppl 1*, 627–633. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01241.x>
- Wester, V. L., & van Rossum, E. F. C. (2015). Clinical applications of cortisol measurements in hair. *European Journal of Endocrinology*, *173*(4), M1-10. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0313>
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., Gossen, J. A., Esposito, G., van Duin, M., & Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, *296*(2), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.038>
- Yang, F., Ruan, Y.-C., Yang, Y., Wang, K., Liang, S., Han, Y., Teng, X.-M., & Yang, J.-Z. (2015). Follicular hyperandrogenism downregulates aromatase in luteinized granulosa cells in polycystic ovary syndrome women. *Reproduction (Cambridge, England)*, *150*(4), 289–296. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0044>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, & World Health Organization. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*, *92*(5), 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>
- Zeginiadou, T., Papadimas, J., & Mantalenakis, S. (2000). Acrosome reaction: Methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, *32*(6), 335–343. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00359.x>

Zhu, W.-J. (2020). Ultrastructural Morphology of Human Sperm Principal Piece. En W.-J. Zhu (Ed.),

*Atlas of Human Sperm Ultrastructural Morphology* (pp. 193–222). Springer.

[https://doi.org/10.1007/978-981-15-5325-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5325-7_5)

## 7 . ANEXOS

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **NOMBRE DEL ESTUDIO: EFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO**

Investigadores: M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González, Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie, Dr. Juan Carlos Solís Sáinz y Dra. Rosa Martha Pérez Serrano.

Por medio de este documento se le invita a participar en una investigación que se llevará a cabo en el **Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular** de la **Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Querétaro** con el fin de contribuir a la salud y a la población en general.

Si usted desconoce palabras o conceptos, siéntase con la libertad de preguntar cualquier duda y con mucho gusto resolveremos sus inquietudes.

#### **A) Propósito de la investigación**

En este estudio se pretenden evaluar el efecto que tienen la testosterona e hidrocortisona sobre parámetros relacionados a la función de los espermatozoides.

Explicación: Después de la eyaculación, el espermatozoide debe de llevar a cabo dos procesos llamados capacitación y reacción acrosomal (RA) para lograr la fecundación. En ambos procesos, existe un canal llamado CatSper que induce a la hiperactivación del batido flagelar y a la RA; es decir, que los espermatozoides sean más rápidos en su nado y que sean capaces de penetrar la membrana del óvulo inmaduro.

Existen estudios que indican que la testosterona e hidrocortisona en concentraciones fisiológicas puede detener la activación de CatSper funcionando como un factor anti-capacitante.

Por ello, el objetivo de este estudio es analizar los efectos de diferentes concentraciones de estas hormonas sobre la capacitación y RA del espermatozoide.

Los resultados contribuirán a la mejora de tratamiento de infertilidad y en el desarrollo de mejores anticonceptivos masculinos reversibles.

## **B) Participación voluntaria**

La participación en esta investigación es de **carácter totalmente voluntario**, es decir, usted puede decidir si quiere o no participar. Puede suspender su participación en el estudio en cualquier momento y es importante resaltar que **no se le pagará por su participación**.

## **C) Procedimiento de la investigación**

- **Historia clínica:** Recolección de datos.  
Se le aplicará una pequeña entrevista en donde se le preguntarán antecedentes personales y familiares que tengan alguna relación con los parámetros que se medirán en este protocolo de investigación.
- **Pruebas de laboratorio:** Espermiograma y pruebas de funcionalidad.  
Se requerirá que usted nos proporcione una muestra de semen en un frasco nuevo y estéril que se le entregará. Dicha prueba servirá para medir algunos parámetros como el tiempo de licuefacción, color, volumen, viscosidad, pH, motilidad (tipos de movimiento de los espermatozoides), concentración de espermatozoides, vitalidad (porcentaje de espermatozoides vivos) y morfología (forma de los espermatozoides). Además, también se realizarán algunas pruebas para conocer qué tan funcionales son sus espermatozoides.

NOTA: La muestra se empleará únicamente para realizar los análisis establecidos en esta carta de consentimiento informado, es decir, no se realizarán pruebas adicionales. Una vez que se hayan concluido los análisis pertinentes, se procederá al desecho de la muestra de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de tal manera que no se pueda emplear para ninguna otra determinación.

## **D) Selección de participantes**

1. Hombres entre 18 a 45 años
2. Que no tengan diagnóstico de abuso de drogas o cualquier otra sustancia.

## **E) DURACIÓN**

Usted deberá acudir a las instalaciones de la Facultad de Medicina, UAQ únicamente una vez.

Si desea sus resultados en físico, agendaríamos cita con usted para que pase a recogerlos y si no, se los podemos proporcionar vía correo electrónico.

## **F) RIESGOS**

Dentro de los procedimientos, la única parte donde se pueden presentar molestias es en la toma de la toma de tensión arterial ya que el aparato puede llegar a apretar un poco la muñeca.

## **G) MOLESTIAS**

Es posible que al tomar la tensión arterial sienta un poco de molestia.

## **H) BENEFICIOS**

- ✓ Las pruebas que se le realicen no tendrán ningún costo.
- ✓ Usted conocerá sus parámetros de calidad de espermatozoides.
- ✓ Se le harán saber los resultados de los estudios y además le brindaremos orientación necesaria. Se le informará acerca de cualquier hallazgo significativo que surja durante el curso de esta investigación.

## **I) CONFIDENCIALIDAD:**

Toda la información será manejada por medio de códigos que hacen imposible su identificación por nombre completo. La información que incluya su nombre, dirección u otros datos personales sólo será registrada en el expediente del protocolo de investigación, el cual será consultado únicamente por los investigadores involucrados en el estudio. La información será guardada por un periodo máximo de cinco años. Si los resultados de esta investigación fueran presentados en artículos científicos, congresos o reuniones médicas y científicas, su identidad no será revelada. En caso de que los estudios o las evaluaciones llevadas a cabo durante el estudio, muestren hallazgos que se consideren de importancia para la evolución y/o tratamiento del cuadro clínico, se solicitara su autorización para ser comunicados a su médico tratante.



**FACULTAD DE MEDICINA**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído la carta de consentimiento informado y entiendo de qué se trata el estudio. He hablado directamente con el responsable del estudio y ha contestado todas mis preguntas en términos que he podido entender. Puedo hacer cualquier pregunta en cualquier momento de la investigación. Recibí una copia de esta hoja de información.

Entiendo que puedo suspender mi participación en el estudio en cualquier momento sin que esto tenga consecuencias en mi relación con la institución. Mi identidad no será revelada en ninguna referencia del estudio o sus resultados. Además, recibí una copia de la carta de consentimiento.

Si tengo dudas o requiero información adicional respecto al estudio, puedo comunicarme con la M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González (87-11-58-85-33)

**ACEPTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO**

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del participante

Investigador \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

En caso de suspender mi colaboración, autorizo que sigan utilizando mi información hasta que concluya la investigación:

Sí \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_

Me gustaría recibir información acerca de otros protocolos de investigación que se lleven a cabo en la Facultad.

Sí \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_