

Enrique Castellón - Andreína Cesari - Miguel Fornés

Biología de la gameta masculina

Desde lo básico a nuevos enfoques
para preguntas conocidas

Universidad Nacional
de Mar del Plata



Biología de la Gameta Masculina

*Desde lo básico a nuevos enfoques
para preguntas conocidas*

**Enrique Castellón
Andreina Cesari
Miguel Walter Fornés**



Castellón, Enrique

Biología de la gameta masculina : desde los básico a nuevos enfoques para preguntas conocidas / Enrique Castellón ; Andreina Cesari ; Miguel W. Fornés. - 1a ed. - Mar del Plata : EUDEM, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-4440-22-8

1. Biología. 2. Espermatozoides. I. Cesari, Andreina II. Fornés, Miguel W. III.

Título

CDD 571.845

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723 de Propiedad Intelectual.

Prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio o método, sin autorización previa de los autores.

ISBN: 978-987-4440-22-8

Este libro fue evaluado por el Dr. Mariano Buffone

Fecha de edición: mayo 2018

© 2018, Enrique Castellón, Andreina Cesari y Miguel Walter Fornés

© 2018, EUDEM

Editorial de la Universidad Nacional de Mar del Plata

EUDEM / 3 de febrero 2538 / Mar del Plata / Argentina

Imagen de tapa: Fertilización *in vitro* entre espermatozoides y ovocitos de hamster (magnificación 100 X). Se ve la unión de los espermatozoides con la zona pelúcida del ovocito.



Libro
Universitario
Argentino

Nota introductoria:

Este manual se desarrolla desde una escritura simple y amena, tomando lo básico de cada tópico para dar pie a algunos de los muchos interrogantes en el campo de la biología celular y molecular aplicada al espermatozoide de mamíferos, en particular, a los estudiados por los autores del presente manual.

INDICE

1. Estructura del espermatozoide	13
1.1. Avances en la organización de la membrana espermática	16
2. Origen del espermatozoide	19
2.1. Organización general del testículo	19
2.2. Túbulo seminífero y espermatogénesis	20
2.3. Intersticio testicular	27
2.4. Avances en el conocimiento del desarrollo del flagelo	30
3. Maduración del espermatozoide	35
3.1. Organización general del epidídimo	36
3.2. Histología del epidídimo	37
3.3. Fisiología del epidídimo	38
3.4. Avances en la asociación de espermatozoides	40
4. Adquisición de la capacidad fertilizante	47
4.1. Cambios funcionales	48
4.2. Cambios intracelulares	50
4.3. Cambios en la superficie espermática	52
4.4. Avances el estudio de inhibidores de serina proteasas que regulan la fisiología espermática	54
5. Ambiente del espermatozoide	65
5.1 Glándulas Anexas	65
5.1.1. Vesícula seminal	66
5.1.2. Próstata	68
5.1.3. Glándulas bulbouretrales o de Cowper	68
5.1.4. Glándulas uretrales de Littre	70
5.1.5. Glándulas ampulares	70
5.2. Semen	72
5.2.1. Composición general del semen	72
5.2.2. Función del fluido seminal	73
5.2.3. Aportes de órganos y glándulas accesorias al fluido seminal	73

5.2.4. Características generales del eyaculado	78
5.2.5. Avances en la utilización de plasma seminal para mejorar la calidad del semen congelado en especies de interés pecuario	79
6. La próstata	93
6.1. Anatomía y morfología de la próstata	93
6.2. Desarrollo embrionario	94
6.3. Organización celular de la próstata	95
6.4. Fisiología prostática	97
6.5. Patología prostática	98
6.6. Avances en nuevos enfoques terapéuticos para el cáncer prostático	108
Autores	119

Dedicamos esta obra a nuestras compañeras/os de vida, porque sin ellos no seríamos lo que somos.

A Loreto, por la comprensión y apoyo en todos los momentos de este largo camino.

A Diego, por ser una permanente fuente de inspiración.

A Andrea, por su apoyo incondicional.

Agradecimientos:

Los autores agradecen a la Secretaría de Políticas Universitarias (SPU) del Ministerio de Educación por el otorgamiento del subsidio Número: 11- 11- 066 (Resolución 1492/10) del programa de Fortalecimiento de Redes Interuniversitarias IV, porque sin el mismo no se podrían haber concretado las reuniones previas de difusión del conocimiento de los tópicos desarrollados en este Manual ni la obra que está leyendo.

Es justo agradecer también al comité directivo de la II Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina por permitirnos presentar allí un simposio satélite de los avances contenidos en esta obra.

También debemos agradecer a la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo por permitirnos desarrollar un simposio en Chile durante la XXII Reunión Anual realizada en Viña del Mar entre el 31 de agosto y el 3 de septiembre de 2011.

Agradecemos a la sociedad de Biólogos en Red por las presentaciones en la ciudad de Mar del Plata durante el Simposio de Biología de la Reproducción que tuvo lugar en su VI reunión anual.

Estas reuniones y el manual no hubiesen sido posibles sin la participación de las Universidades: Universidad Nacional de Mar del Plata, Universidad Nacional de Cuyo y Universidad de Chile, a quienes agradecemos su confianza y aval para este proyecto.

Capítulo 1

Estructura del espermatozoide

Miguel Walter Fornés

El espermatozoide es una célula móvil, altamente compartimentada y de tipo terminal. Muchas de las funciones de otros tipos celulares están ausentes y otras, al contrario, están muy desarrolladas. Así, por ejemplo, la síntesis de proteínas (u otras moléculas celulares) está ausente – aunque algunos lo proponen –, mientras que su velocidad de desplazamiento es muy marcada.

En él se describen una zona que contiene al núcleo y acrosoma, la cabeza, y otra formada esencialmente por un flagelo siempre más largo que la cabeza (Fig. 1A y B). El acrosoma ocupa la zona opuesta a la de implantación del flagelo (región de unión entre cabeza y flagelo), por convención zona anterior (Fig. 1B), y por debajo - en la zona centro-posterior de la cabeza - está el núcleo. En general, el núcleo tiene un eje mayor, que coincide con el eje del flagelo, y en sentido opuesto se amolda el acrosoma al formato del núcleo. Notablemente, la membrana celular acompaña a estas estructuras contorneando perfectamente las formas intracelulares encerrando un escasísimo citoplasma.

El flagelo se implanta en la cabeza espermática en la denominada “fosa implantacional”. Entre la membrana nuclear y el capitolio –aparato de vinculación entre flagelo y cabeza– se describe una condensación llamada “placa basal” (Keizo T. y col., 2012) (Fig. 2). El capitolio está formado por una serie de anillos distribuidos de mayor diámetro a menor. El mayor es vecino a la fosa y el menor se ubica hacia el flagelo. Desde esta estructura se desprenden las fibras o vainas densas externas (Puey Ounjai y col., 2012).

Dentro de esta estructura, y recorriendo todo el centro del flagelo, se observan una serie de pares de microtúbulos ordenados con la fórmula conocida como 9+2 (es decir, 1 pares central y 9 dobletes periféricos, Fig. 3). Dentro de este capitolio se encuentran los centriolos. El mismo está compuesto por 2 subunidades iguales pero opuestas entre sí. De la subunidad en línea con el flagelo –centriolo distal- se desprenden los microtúbulos.

A lo largo del flagelo, desde la vinculación con la cabeza al extremo distal, se reconocen tres zonas, bien distinguibles, denominadas “zona intermedia”, “principal” y “terminal” (Fig. 1). La zona intermedia o pieza media concentra todas las mitocondrias del flagelo ordenándose como una escalera caracol y generando un sector de mayor diámetro (flecha blanca, Fig. 1 A y B). Esta pieza corre desde el capitolio

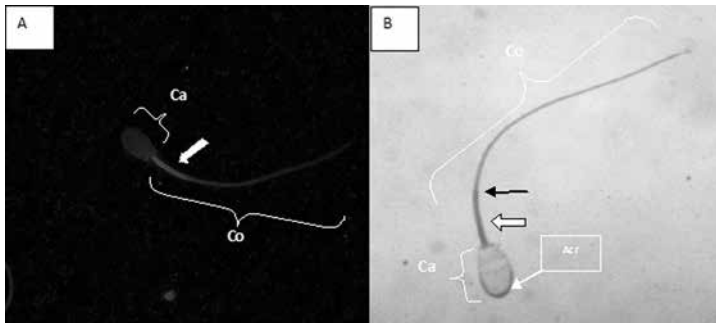


Figura 1. Se muestra un espermatozoide de conejo como ejemplo de espermatozoide de mamíferos. En ellos se aprecia la cabeza (Ca) y la cola (Co) espermática. En el cuadro A se muestra un espermatozoide en el que se tiñó el colesterol con el marcador específico filipina (250X); y en B se observa otro espermatozoide por contraste de fases sin coloración alguna destacándose un reborde oscuro en la zona anterior de la cabeza que corresponde al acrosoma (Acr). En A y B se destaca con una flecha blanca la zona intermedia y con una flecha delgada el annulus, inicio de la pieza principal.

hasta el annulus, un anillo que se manifiesta como un estrechamiento del flagelo debido a que se termina la sucesión de mitocondrias (flecha delgada, Fig. 1 B). A este nivel también se puede observar una condensación proteica electrón-densa (presenta proteínas tipo septina) denominado “Complejo de Septina” (Toure A. y col., 2011). Hacia el centro, luego de las mitocondrias, se pueden observar unas condensaciones del citoesqueleto denominadas “fibras densas externas”. Las mismas son columnas que, en número de nueve, recorren todo el flagelo hasta la pieza terminal, en la que no penetran (Fig. 3).

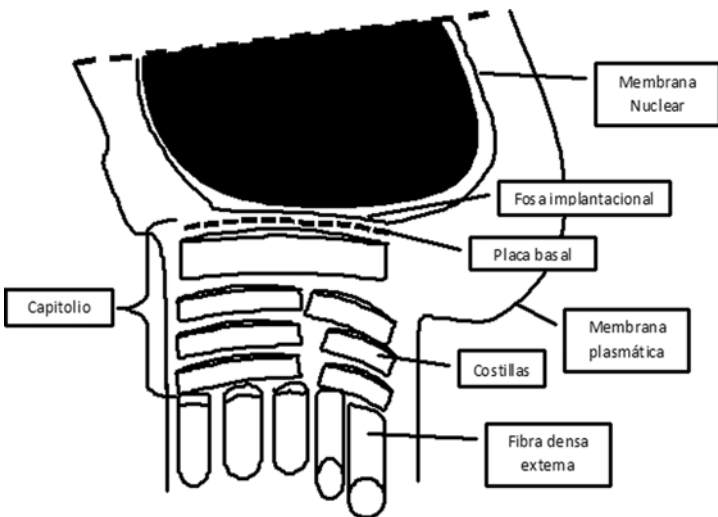


Figura 2. Dibujo esquemático que representa la conexión entre cabeza y cola. La cabeza posee una depresión denominada “fosa de implantación”. Por debajo, algunos autores describen una zona densa llamada “placa basal”, y más distal una serie de condensaciones denominadas “costillas”. La primera es completa, pero las siguientes presentan un fraccionamiento en varias costillas. Desde estas costillas se desprenden las fibras densas externas. Este aparato es variable de acuerdo a la especie.

La zona o pieza principal suele ser la de mayor longitud, carece de mitocondrias pero presenta unas estructuras denominadas “vainas fibrosas”, localizadas por fuera de las fibras densas. Estas son dos columnas que recorren toda la pieza principal terminando antes del inicio de la pieza terminal. Entre ambas vainas fibrosas se extienden unas costillas que las unen y que desaparecen al inicio de la pieza terminal (Fig. 3, B).

La pieza terminal contiene solo la estructura de 9+2 y citoplasma cubierto por la membrana celular (Fig. 3, C).

La estructura de 9+2 es similar a la de los cilios y consiste en un par de microtúbulos centrales y otros nueve dobletes periféricos compuestos por un microtúbulo completo y otro asociado incompleto. En algunas patologías, como los síndromes denominados “de cilios inmóviles”, también se asocia a espermatozoides inmóviles.

Avances en la organización de la membrana espermática

Paola Vanina Boarelli

La distribución de los lípidos en la membrana plasmática (MP) ha sido ampliamente estudiada en la gameta masculina por su rol en la fisiología espermática. La MP presenta una importante regionalización de sus componentes, donde cada uno de ellos se encuentra asociados con otros constituyendo microdominios o subdominios de membrana (sDM). El colesterol, el gangliósido GM1 y la proteína caveolina 1, tres importantes componentes de estos sDM, se encuentran ya desde la espermatogénesis y experimentan cambios durante la maduración espermática, la capacitación y la reacción acrosomal. Caveolina 1, está presente durante los primeros estadios de la espermatogénesis, posiblemente asociado al metabolismo del colesterol, como en otros tipos celulares,

mientras que el gangliósido GM1 estaría asociado a la génesis del acrosoma. En etapas posteriores, tanto el gangliósido GM1 como el colesterol, predominan en el dominio acrosomal de la cabeza de los espermatozoides testiculares que son espermiados.

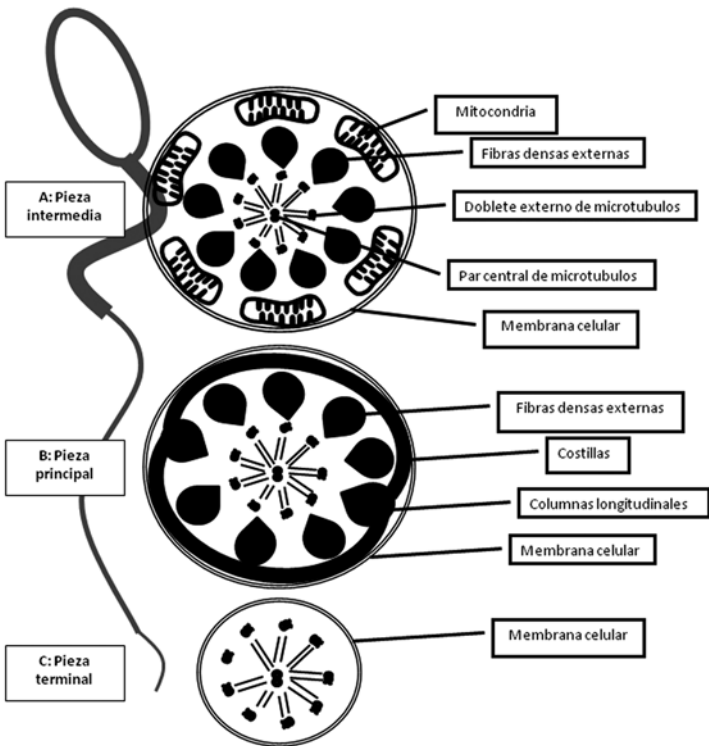


Figura 3. Dibujo esquemático que representa tres cortes perpendiculares al eje del flagelo de un espermatozoide de mamíferos basado en la representación esquemática de Turner (2006). El superior corresponde a la pieza intermedia (A), el medio a la principal (B), y el inferior a la terminal (C).

Referencias

Ounjai, P., Kim, K.D., Lishko, P.V., Downing, K.H. (2012) "Three-dimensional structure of the bovine sperm connecting piece revealed by electron cryotomography". *Biol Reprod* 87, 73, 1–9.

Tokuhiro, K., Isotani, A., Yokota, S., Yano, Y., Oshio, S., Hirose, M., Wada, M., Fujita, M., Ogawa, Y., Okabe, M., Nishimune, Y., Tanaka, H. (2009). "OAZ-t/OAZ3 Is Essential for Rigid Connection of Sperm Tails to Heads in Mouse". *PLoS Genet*, 5(11), e1000712.

Toure, A., Rode, B., Hunnicutt, G.R., Escalier, D., Gacon, G. (2011). "Septins at the annulus of mammalian sperm". *Biological Chemistry*, 392(8-9), 799-803.

Turner, RM. (2006). "Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation". *Repro. Fert and Dev*, 18(1-2), 25-38.

Capítulo 2

Origen del espermatozoide

*Miguel Walter Fornés, Alfonsina Morales y
Elisa Olivia Pietrobon*

El espermatozoide se origina a través de uno de los procesos más espectaculares que tienen lugar en el organismo. Partiendo de una célula madre¹ se culmina en una célula haploide² altamente diferenciada funcional y morfológicamente. Estos cambios se producen dentro de los túbulos seminíferos alojados en el testículo. Veamos brevemente la organización del testículo para comprender el tema.

2.1 Organización general del testículo

El testículo es un órgano ovoide y par que se aloja dentro del escroto en la mayoría de los mamíferos. La localización extra corporal le permite estar a una temperatura inferior en 2 a 3°C a la corporal siendo ésta la temperatura ideal para la espermatogénesis³. Está delimitado por una cápsula firme de tejido conectivo denso denominada “Albugínea”. Desde esta cápsula se desprenden tabiques de tejido conectivo que separan la cavidad en espacios denominados “lobulillos”.

¹ Se denomina así a una célula que es capaz de generarse a sí misma y a su vez diferenciarse en células con funciones específicas. Luego de cada mitosis una de las células hijas queda como célula madre y la otra se diferencia en un linaje típico.

² Se aplica a las células que tienen la mitad del material genético; también se puede decir que sus cromosomas son simples, en lugar de dobles como en las células somáticas, o decir que tiene n moléculas de ADN en lugar de $2n$ (el doble de cantidad de ADN) de las células somáticas.

³ Patologías que comprometen la circulación o el ascenso del testículo a la cavidad abdominal que modifican la temperatura promueven una detención de la espermatogénesis.

Dentro de estas cavidades se encuentran los túbulos seminíferos. Los túbulos son largos cilindros en forma de herradura. Ambos extremos se unen a la *rete testis* (red testicular) que se ubica en el polo superior del órgano. Esta red es un sistema de tubos interconectados que reciben, por un lado, el producto de todos los túbulos seminíferos y, por su extremo superior, originan otros conductos que salen del testículo por orificios en la albugínea denominados “túbulos eferentes”. Estos túbulos desembocan en el epidídimo (Fig. 1).

Entre los túbulos seminíferos quedan espacios dentro de los lobulillos que se conocen como “intersticios”. Estos espacios contienen células del tejido conectivo y las células de Leydig o intersticiales. Las células intersticiales producen testosterona, esencial para el sostenimiento de la espermatogénesis.

2.2 Túbulo seminífero y espermatogénesis

El túbulo seminífero está delimitado por una membrana basal continua conformada por colágeno y, por fuera de ella, células como fibroblastos y mioideas. Estas últimas con función contráctil y una abundancia de elementos del citoesqueleto (Lossino y col. 2012).

La espermatogénesis se produce en el epitelio seminífero. Este epitelio estratificado es un tipo especial de epitelio donde las células germinales se dividen y diferencian hasta formar los espermatozoides que finalmente se liberan hacia la luz tubular. El espermatozoide descamado continúa siendo vital. En otros epitelios estratificados, la última capa de células puede desprenderse normalmente, pero lo hacen como células no viables.

En los epitelios, las células basales son las que sostienen, mediante sucesivas divisiones mitóticas, el envío de células a las capas superiores. En el túbulo seminífero, las

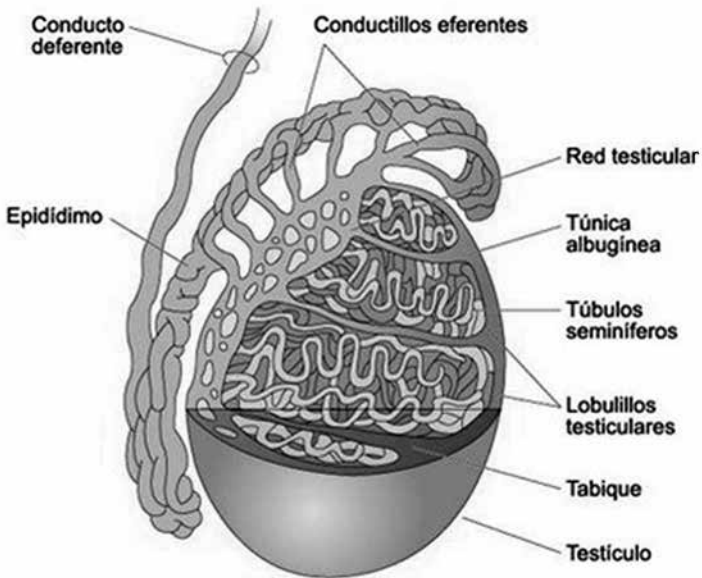


Figura 1. Corte de testículo para mostrar el interior del órgano. (Imagen tomada de internet: <http://3.bp.blogspot.com/-x6E7Qu2pH2s/Tu-8rhbTzjl/AAAAAAAAAJU/iheEAFnOt1U/s1600/Testiculo+y+epididimo+anatomia+8.JPG>), julio 2014).

células basales se denominan “espermatogonias”. Las espermatogonias tienen citoplasma con poca capacidad tintorial, por su pobreza en organelas, y un núcleo relativamente grande (Fig. 2).

Estas células madre se dividen por mitosis generando nuevas células, que pueden continuar siendo células indiferenciadas, las espermatogonias A, o bien quedar comprometidas a entrar en meiosis y en el camino de la diferenciación hacia espermatozoides, que son las espermatogonias B. Tanto las espermatogonias A como las B se encuentran sobre la membrana basal del epitelio.

Las espermatogonias A, a su vez, se denominan “oscuras” o “claras” de acuerdo a la coloración que tome su núcleo debido a la diferente compactación del ADN (Fig. 2).

Las células de Sertoli, columnares altas, se distribuyen entre las espermatogonias a lo largo del epitelio (Fig. 2). Estas células son una de las células más grandes del organismo y poseen una estructura realmente compleja. El núcleo suele ser basal con respecto al epitelio y alargado en sentido perpendicular a la membrana basal. Su membrana nuclear tiene plegamientos o indentaciones y puede tener uno o dos nucléolos muy evidentes

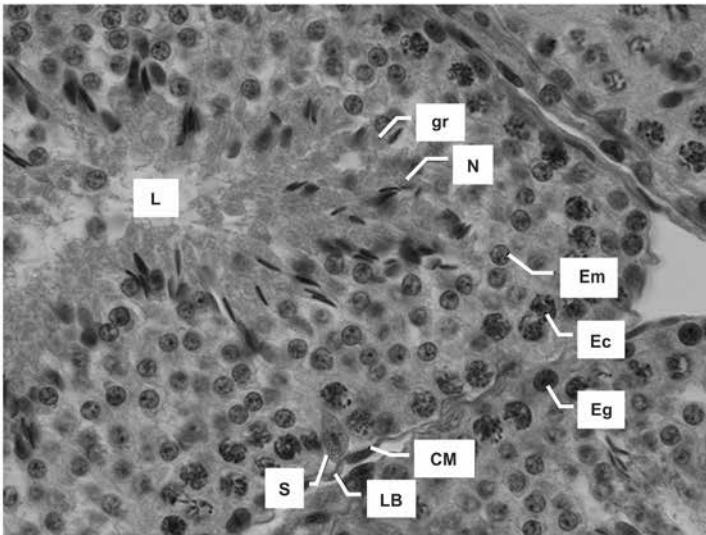


Figura 2. Túbulo seminífero de testículo de conejo. Se puede observar la lámina basal (LB) y las células mioepiteliales (CM). En la zona basal del túbulo se definen espermatogonias (Eg) y células de Sertoli (S). En un nivel superior se observan los espermatocitos (Ec) y las espermatídes (Em). En una zona más cercana al lumen (L) se observan diferentes etapas de la espermiogénesis notándose núcleos de espermatídes compactos y alargados (N) y gotas residuales (gr).

Las células de Sertoli poseen prolongaciones laterales que se unen fuertemente unas a otras por uniones ocluyentes⁴, dejando así dos zonas: una superior, el compartimiento adluminal –cerca de la luz tubular donde se desarrolla la espermatogénesis– y el compartimiento basal, por debajo de las prolongaciones/uniones sertolianas. De este modo queda constituida la denominada “Barrera hemato-testicular”⁵, donde las espermatogonias quedan aisladas en el compartimiento basal de las células germinales más diferenciadas.

Las células de Sertoli poseen también prolongaciones hacia el lumen –el centro del túbulo– muy largas, ramificadas y con oquedades, en las que se alojan las células espermáticas en formación.

La meiosis es el proceso que permite la reducción a la mitad del material genético con la formación de las gametas y la variabilidad de la especie. En un momento dado, las espermatogonias tipo B entran en meiosis⁶. Al final de la fase S del último ciclo celular⁷, cuando la célula tiene el doble del ADN de una espermatogonia (4n), entra en la Profase I (la primera profase de la meiosis). En este momento se transforma en espermatocono primario (cito I). Durante la profase, el espermatocono I (leptotene) deberá dejar el compartimiento basal, atravesar la barrera hemato-testicular y ascender al compartimiento adluminal (como zigotene). Las células de Sertoli reconocen señales específicas, desensamblan las

⁴ Estas uniones son similares a las descritas en los epitelios, incluso molecularmente.

⁵ Se denomina así al concepto o la idea que propone que sustancias presentes en la sangre no pueden atravesar estas barreras. Determinando así, un compartimiento separado del resto del organismo.

⁶ Proceso por el cual el material genético se reduce a la mitad pero que también permite la variabilidad ya que en una de sus etapas se intercambian sectores de las cromátidas.

⁷ Se conoce como ciclo las etapas por las que pasa una célula durante su ciclo vital. No es la mitosis solamente sino el proceso por el cual se prepara citoplásmica y nuclearmente para generar dos células hijas.

uniones por arriba y las ensamblan por debajo dejando pasar al cito I. De ahora en más, todas las etapas que se sucedan, cambios morfológicos y funcionales, se darán en las cavidades que las células de Sertoli le ofrecen a estas células. Por ello también se las denomina “nodrizas”, queriendo significar que no es un acompañamiento pasivo sino una interacción estrecha entre ambas células la que permite el desarrollo de la espermatogénesis.

Desde el espermatocito I en adelante se verifican dos divisiones sucesivas de meiosis dentro del compartimiento adluminal, por sobre la barrera hemato-testicular (aislado del organismo) y soportado por la interacción sertoli-gonia.

El cito I sufre la primera división por lo que de $4n$ pasa a $2n$ (reduce el total de moléculas de ADN, por ello llamada “reduccional”) originando los denominados espermatoцитos secundarios (citos II), difíciles de visualizar porque inmediatamente entran en la segunda división sin sintetizar DNA, es decir, no tienen fase S en este ciclo celular. Así se generan espermátides con $1n$ de DNA (una copia simple del DNA). Estas espermátides son células redondas y entran en la etapa final que se denomina espermiogénesis.

Espermiogénesis

Como hemos visto, las espermátides son células haploides, redondas y están localizadas en las criptas de las células Sertolianas. Un largo proceso le espera hasta ser un espermatozoide listo para abandonar el testículo. Al menos cuatro grandes cambios se deben realizar en forma coordinada y simultánea: transformación nuclear, formación del acrosoma y flagelo, y redistribución -con pérdida- del citoplasma.

El núcleo celular post meiótico ($1n$) ha sufrido también un recambio de las proteínas nucleares clásicas –histonas– por protaminas. Estas protaminas permiten un enrollamien-

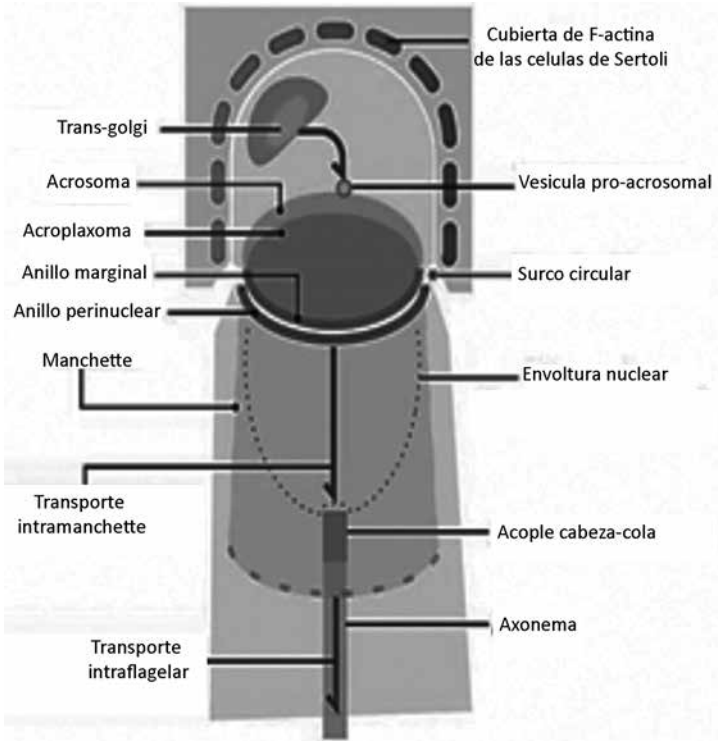


Figura 3. Componentes principales de la transformación de espermatocito a espermátide en elongación -desde una célula y su núcleo- esféricos a una célula alargada- por modificaciones simultáneas de los componentes celulares. La espermátide se representa como una célula alargada con dos zonas: una anterior, que origina el acrosoma y aloja al núcleo, y otra posterior (más ancha y aún más larga) que en parte sale del citoplasma de la célula de Sertoli (superficie punteada en el esquema). Esta última forma el nexo entre cabeza y cuello hasta el flagelo terminal.

to mayor del ADN espermático. Además, también soporta una compactación de todo el material nuclear generando uno de los núcleos celulares más compactos del organismo. Cabe recordar que esta célula será exportada fuera del or-

ganismo por lo que se debe proteger el material nuclear. El núcleo también sufre una transformación propia de cada especie ya que su forma final dentro de la forma que adquiere la cabeza espermática sirve para clasificar especies. El núcleo entra en contacto con un aparato que actualmente se denomina “acroplaxoma” –pero que en trabajos previos se reconocía como “perforatorio”– localizado en la región entre membrana nuclear y acrosoma, específicamente membrana acrosomal interna (Fig. 3). Este medio de unión entre ambas estructuras permite que al ser traccionado por el sistema de microtúbulos, se los moldee hasta que se alcance la forma típica de la especie en cuestión. Entonces, la combinación de la compactación del material nuclear más el modelado por la tracción del citoesqueleto genera un núcleo definitivo (Kierszenbaum y col. 2011).

El acroplaxoma o perforatorio forma parte del citoesqueleto de esta célula. El citoesqueleto en el flagelo tiene un inicio en el centrosoma, en la zona posterior u opuesta al acrosoma. Este centrosoma tiene dos partes: los centriolos y una nube de proteínas asociadas. Los centriolos se colocan uno perpendicular a otro, siendo el que se orienta en el sentido del flagelo, el activo en generar el esqueleto del flagelo. En esta zona de unión entre la cabeza en desarrollo y el futuro flagelo se va estructurando la pieza de conexión entre ambas estructuras. Esta pieza de conexión es variable según la especie pero en general tiene zonas electrón-densas que rodean al par central de la estructura clásica de 9+2 de un flagelo⁸ (véase más arriba). La condensación mayor tiene una aposición con una fosa delimitada por la membrana nuclear en el núcleo. A medida que se sintetiza el material del flagelo

⁸ La estructura celular conocida como flagelo, similar a la de los cilios, es una proyección citoplásmica cubierta por la membrana celular. Posee un esqueleto interno compuesto por un par central de microtúbulos y nueve pares periféricos, uno de ellos incompleto. Estos se insertan en el centriolo distal del par de centriolos localizados en el capitolio.

comienza a elongarse la estructura de 9+2. Simultáneamente, el aparato de Golgi se desplaza a la zona que será el extremo anterior de la cabeza opuesta al flagelo. Lo producido en las cisternas del aparato se vehiculiza por vesículas cargo que se fusionan a la membrana del futuro acrosoma y descargan su contenido. Esta cisterna gigante asociada al acroplaxoma y traccionada por los microtúbulos se “amolda” a la forma del núcleo quedando comprimida entre la membrana nuclear y la citoplásmica generando el acrosoma.

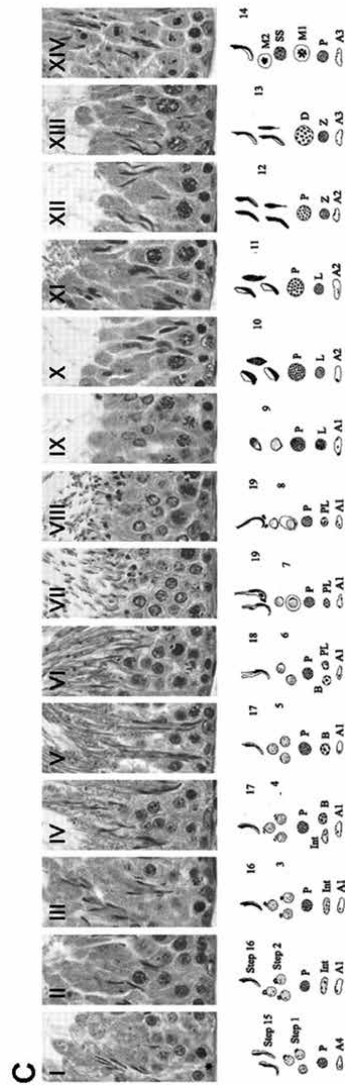
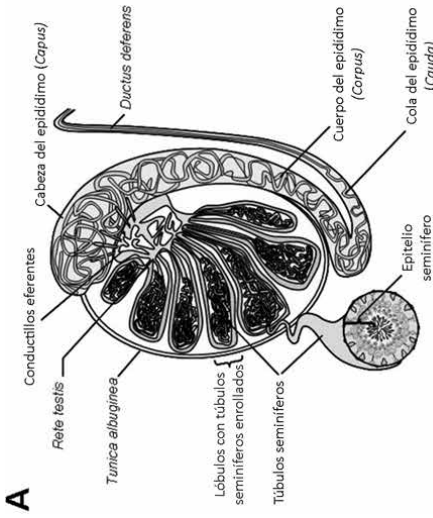
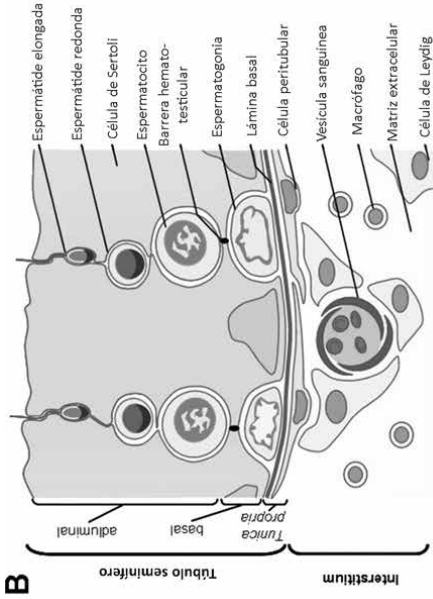
Las células de la serie espermática que sucesivamente se van originando conforman un mosaico de células que se asocian siguiendo un patrón. Así, por ejemplo, en la rata se reconocen catorce asociaciones de células de la serie (Fig. 4). Esta progresión y su duración fueron descritas por Clermont y colaboradores en la década del 50 (Clermont y col., 1959). Es interesante que también el tipo de proteínas reconocidas por Maltidoff tiene un patrón típico (Lagarrigue y col., 2011). Esta distribución celular debe ser tomada en cuenta al momento de evaluar biopsias o estados nutricionales porque pueden modificarse o malinterpretarse, ya que hay estadios normales que sin embargo no muestran espermatozoides luminales, y no significan una detención de la espermatogénesis.

2.3 Intersticio testicular

El espacio entre los túbulos seminíferos y los tabiques que separan los lobulillos intratesticulares son también un espacio linfático que se conecta con los vasos linfáticos que abandonan los testículos y que tienen relevancia en la diseminación de los cánceres de origen testicular. Dentro de estos espacios se localizan las células intersticiales de Leydig junto a otros tipos como fibroblastos, células de Cajal y macrófagos (Fig. 4). Las células de Leydig son productoras de testosterona y por

ello tienen las estructuras típicas de las células que producen hormonas de tipo esteroideas, un retículo endoplásmico liso muy desarrollado en íntima relación a las mitocondrias y vacuolas que acumulan colesterol, por un lado, y secreciones por otro. Las mitocondrias tienen un desarrollo de sus crestas muy marcado, denominadas tubulares, y espacios intramitocondriales bien definidos.

Figura 4. Ciclo del epitelio seminífero. En A se puede observar un corte de testículo. En B se muestra el citoplasma de la célula de Sertoli y en sombreado más oscuro, el núcleo. Se muestran las células de la espermatogénesis. En la mitad del dibujo se delinea la lámina basal. Desde ésta hacia abajo se representa el intersticio. La serie de fotos (I a XIV) del panel C y la representación de las mismas células en la línea inferior permiten definir qué células se encuentran en cada estadio. Esta clasificación se basa en la morfogénesis del acrosoma. Se esquematizan espermatogonias (A1, A2, A3, A4), estadios intermedios (Int y B) y espermatoцитos (preleptotene (PL), leptotene (L), zygotene (Z), paquitene (P), diplotene (D), M1, y M2). Imagen adaptada (<http://www.mcponline.org/content/10/3/M110.005991.full.pdf+html>, Fig 2A).



2.4 Avances en el conocimiento del desarrollo del flagelo

Maria Eugenia Cabrillana

Las Fibras Densas Externas (ODF, del inglés “Outer Dense Fibers”) son el mayor componente citoesquelético del flagelo. Encontramos nueve de ellas en la pieza media y siete en la pieza principal; cada una posee una forma y tamaño característico y se distingue por microscopía electrónica una región cortical más electrondensa y una región medular, menos electrondensa. Del análisis en geles de poli(acrilamida), se deduce que al menos seis polipéptidos mayoritarios componen las fibras densas externas, y sus pesos moleculares oscilan entre los 11 a 87 kDa (Eddy 2006, Oko 1988).

La primera proteína en conocer su identidad fue ODF1, cuya localización es medular. Ésta tiene un peso molecular de 27 kDa, posee dos dominios funcionales, uno amino terminal anfipático que presenta una estructura alfa hélice, tipo cremallera de leucina, que funcionaría como cebo para la interacción con otras proteínas. En la porción media de ODF1, entre los aa 129 y 203, se determinó un dominio conservado alfa cristalino característico de Heat Shock Proteins (Kappé y col. 2003). La porción carboxilo terminal es una repetición de cisteína, glicina y prolina (Van der Hoorn y col. 1990; Bhullar y col. 2003; Rosales y col. 2007). Por otro lado, su elevado contenido en cisteínas la convierte en blanco de cambios redox durante el tránsito epididimario (Calvin y col. 1971). Además, espermatozoides de ratones heterocigotas (+/-) para el gen *odf1*, poseen alterada su capacidad de moverse progresivamente (Yang y col. 2011).

La oxidación de los sulfhidrilos durante el tránsito epididimario genera un aumento en los puentes disulfuro, lo que se traduce en una mayor estabilidad de la proteína.

Esta disminución en tioles disponibles se ha evidenciado por la disminución en la solubilidad de la proteína al SDS y por la disminución en la afinidad a marcadores específicos de tioles, como lo es el monobromobimane (mBBr). Éste es un fluoróforo permeable a la membrana plasmática de células vivas (Kosower y col. 1987).

La especificidad de mBBr por ODF1 fue determinada por espectrometría de masas, a través de la cual se conocieron las cisteínas involucradas en la reacción. Finalmente, si se observan espermatozoides móviles en presencia de mBBr se puede detectar una disminución en el movimiento progresivo de los mismos (Cabrillana y col. 2011).

Referencias

Bhullar B., Zhang Y., Junco A., Oko R., van der Hoorn F.A. (2003). "Association of kinesin light chain with outer dense fibers in a microtubule-independent fashion". *J. Biol. Chem.* 278, 16159-16168.

Cabrillana, M.E., Monclus, M.A., Saez Lanzelotti, T.E., Boarelli, .PV., Clementi M.A., Vincenti, A.E., Yunes, R.M.F., Fornés, M.W. (2011). "Characterization of flagellar cysteine-rich sperm proteins, involved in motility, by the combination of cellular fractionation, fluorescence detection and mass spectrometry analysis". *Cytoskeleton (Hoboken)*, 68, 9, 491-500.

Calvin H.I., Bedford J.M. (1971). "Formation of disulphide bonds in the nucleus and structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis". *J Reprod Fertil Suppl* 13, 65-75.

Clermont Y., Leblond C.P., Messier B.(1959) "Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat". *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 48, Suppl, 37-55.

Eddy, E.M. (2006) "The spermatozoon". In: Neill, JD. editor. *Physiology of Reproduction.* 1–54.

Fibers of rat spermatozoa". *Biology of Reproduction* 39, 169-182.

Kappé G., Frank E., Verschuure P., Boelens W.C., Leunissen J.A.M., de Jong W.W. (2003). "The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10". *Cell stress and Chaperones*, 8, 1, 53-61.

Kierszenbaum A.L., Rivkin E., Tres L.L. (2011) "Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility". *Spermatogenesis* 1, 3,221-230.

Kosower N.S., Kosower E.M. (1987). "Thiol labeling with bromobimanes". *Methods Enzymol* 143, 76-84.

Lagarrigue M., Becker M., Lavigne R., Deininger S.O., Walch A., Aubry F., Suckau D., Pineau C. (2010) "Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution". *Mol Cell Proteomics.* 10, 3,M110.005991.

Losinno, A.D., Morales A., Fernandez D., Lopez L.A. (2012) "Peritubular Myoid Cells from Rat Seminiferous Tubules Contain Actin and Myosin Filaments Distributed in Two Independent Layers". *Biol. Reprod.*, 86, 5, 150.

Oko, R. (1988). "Comparative Analysis of Proteins of Fibrous Sheath and Outer dense fibers of rat spermatozoa". *Biol. Reprod.*; 39 (s): 169-82.

Rosales JL, Sarker K, Ho N, Broniewska M, Wong P, Cheng M, van der Hoorn FA, Lee KY. (2007) ODF1 phosphorylation by Cdk5/p35 enhances ODF1-OIP1 interaction. *Cell Physiol Biochem*; 20(5): C311-C318, 2007.

Van der Hoorn F.A., Tarnasky H.A., Nordeen S.K. (1990). "A new rat gene RT7 is specifically expressed during spermatogenesis". *Dev. Biol.* 142, 147–154.

Yang, K., Meinhardt A., Zhang, B., Grzmil, P., Adham, I., Hoyer-Fender S. (2012). "The Small Heat Shock Protein ODF1/HSPB10 Is Essential for Tight Linkage of Sperm Head to Tail and Male Fertility in Mice". *Mol. Cell. Biol.*, 32, 1,216.

Capítulo 3

Maduración del espermatozoide

Miguel Walter Fornés

Luego de abandonar el epitelio seminífero, los espermatozoides avanzan a través de la *rete testis* y dejan el testículo por los túbulos eferentes que los transportarán a la primera parte del epidídimo o segmento inicial de la cabeza del epidídimo. En este trayecto, si bien menos estudiado, comienza a extraerse parte del agua que viene del testículo – es una zona rica en aquaporinas con dependencia de estrógeno y testosterona (Oliveira y col. 2005) y también se ha descrito la fagocitosis de espermatozoides (Sutovsky y col. 2001). Como consecuencia de la retención de agua, los espermatozoides terminan altamente concentrados al final del tránsito epididimario. Ya en el epidídimo, la gameta masculina sufre una serie de cambios estructurales, funcionales, bioquímicos y asociativos conocidos como “maduración espermática”, que en términos sencillos indica que el espermatozoide que pasó por el epidídimo está en mejores condiciones de fecundar al ovocito cuando se enfrenta a él durante la fertilización. Aún le queda otra etapa antes de llegar al óvulo que es el trayecto que realizará por el tracto genital femenino sufriendo aquí otra serie de cambios conocidos como “capacitación del espermatozoide”. Ahora sí, luego de madurar y capacitarse, estará en condiciones de fecundar al óvulo.

El colesterol y los esfingolípidos asociados a proteínas como caveolinas u otras, conforman microdominios de membrana denominados balsas (*raft* en inglés) dentro de la membrana plasmática, tanto en espermatozoides como otras células del organismo.

Los espermatozoides tienen estos microdominios o subdominios (sDM), como se explicó en el primer capítulo. Durante el tránsito epididimario presentan características similares de membrana a los testiculares, tanto para colesterol como para el esfingolípido denominado gangliósido GM1. Es decir, existe un predominio de estos componentes en el dominio acrosomal de la cabeza y la pieza media del flagelo de los espermatozoides. Durante la capacitación espermática en el tracto genital femenino o su equivalente *in vitro*, los espermatozoides sufren una pérdida de colesterol desde estos sDM que desencadena toda una vía de señalización, mientras que gangliósido GM1 se limita al acrosoma apical. Los espermatozoides que sufren reacción acrosomal pierden tanto gangliósido GM1 como caveolina 1 desde el acrosoma apical. Además, el bloqueo de gangliósido GM1 por la toxina colérica en ovocitos o espermatozoides presenta una disminución significativa en la unión entre las membranas, espermática y ovocitaria.

Estos cambios indican que estos componentes tienen un comportamiento dinámico durante la vida espermática lo cual indicaría que el ensamblaje o el desmontaje de estas estructuras ocurren en respuesta a los diferentes ambientes por los que transita el espermatozoide y que son necesarios para la fertilización.

3.1 Organización general del epidídimo

El epidídimo es un órgano tubular único de una longitud considerable que se dispone globalmente como un sistema de curvas, contra curvas y sobrepasos sin conectarse entre sí manteniendo la continuidad. Por ello la dirección es única, el tubo también, y el epitelio también es un continuo aunque con variaciones regionales. Estos tubos en “zigzags”

se van acumulando en unas regiones más que en otras y permite observar un sector inicial engrosado, denominado “cabeza del epidídimo” o “kaput”; seguido de otro sector con menos curvas, más alargado, denominado “cuerpo” y, finalmente, otra zona con mayor número de giros y mayor diámetro del mismo túbulo que da una región más gruesa denominada “cola” o “cauda epididimaria”. Estas tres regiones coinciden con diferentes funciones que ejerce el epidídimo sobre los espermatozoides que están transitando.

El espermatozoide que llegó del testículo vía conductos eferentes ingresa a la cabeza del epidídimo acompañado de las secreciones del túbulo seminífero. Aquí se absorbe parte de ese fluido –sobre todo agua– generándose un mecanismo de corriente que explicaría en parte el tránsito desde la *rete testis* al epidídimo. No se puede descartar que células con función contráctil de la pared de estos túbulos tengan efecto.

3.2 Histología del epidídimo

El epitelio, en general, es cilíndrico pseudoestratificado con estereocilios⁹ en la superficie luminal. La mayor parte de estas células son las denominadas “células principales” que tienen funciones absorptivas y secretorias (Fig. 1).

El segmento de cuerpo también posee el mismo epitelio pero de menos altura, en tanto que en cauda, el epitelio

⁹ Pseudoestratificado: Se aplica a epitelios de células cilíndricas en los que parece que las células estuviesen a diferentes alturas pero solo los núcleos se colocan a diferentes niveles, todas las células contactan con la membrana basal y por su zona apical llegan a la superficie luminal.

Esterocilios son microvellosidades gigantes, no son un cilio grande. No poseen movimiento ya que no tiene los microtubulos centrales tipo 9+2. Si aumentan notablemente la superficie de contacto/intercambio entre espermatozoides y el epitelio. Estereocilio es una proyección de la membrana citoplásmica similar a una vellosidad clásica pero su largo es muy superior tal es así que en ocasiones parecen llenar la luz del epidídimo.

comienza al inicio a disminuir de espesor y hacia el conducto deferente es cúbico simple.

Entre las células principales se han descrito otros tipos celulares como las denominadas células pincel, de Clara y otras con funciones aún por definir.

3.3 Fisiología del epidídimo

El epitelio descrito debe cumplir con las funciones principales de cada región epididimaria. Tal es así que la secreción, mayormente andrógeno dependiente, está vinculada a las funciones que debe realizar cada una de las regiones.

La primera región –kaput– debe absorber el fluido que acompaña a los espermatozoides más arriba comentado. En tanto que el cuerpo secreta una serie de proteínas, glicoproteínas y factores capaces de promover la maduración espermiática. Mientras que la cauda epididimaria es la encargada de almacenar los espermatozoides maduros hasta el momento eyaculatorio. Una revisión reciente puede completar estas ideas (Cooper 2011).

En el corpus se verifica que el epitelio vuelca sus secreciones, como proteínas (véase el review de Cohen y col., 2011 para una de ellas, la CRISP 1) y también de enzimas de tipo hidrolíticas, hidrolasas ácidas, destinadas a asociarse a la membrana del espermatozoide o regular funciones como la asociación de los espermatozoides y/o etapas posteriores que debe cumplir el espermatozoide como reacción acrosomal o fertilización (véase “Avances” más adelante). Pero si resulta curioso que la secreción contribuye a un ambiente madurante –extracelular– por el que viajan las gametas, también lo es que parte de la secreción es por exocitosis en la que pequeñas vesículas abandonan el epitelio epididimario (Review: Sullivan R y col., 2007; Fornés y col., 1991 a y b).

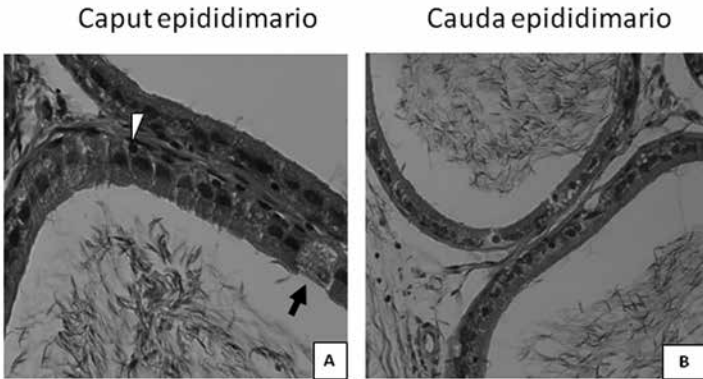


Figura 1. El túbulo epididimario se puede observar en cortes histológicos convencionales como tubos paralelos separados por espacios triangulares ocupados por tejido conectivo laxo con gran vascularización. El epitelio está constituido por células denominadas principales –lejos, las más abundantes– cilíndricas, altas y con un núcleo único y central. La altura de ellas es máxima en la zona de caput y disminuye hacia la zona distal. Entre las células principales aparecen otras más claras en coloración –de allí su nombre de células claras– con su núcleo hacia la zona apical y gran cantidad de vacuolas hacia basal (flecha). También se pueden observar las llamadas células basales ubicadas sobre la membrana basal, discretas de núcleo redondo y escaso citoplasma (cabeza de flecha blanca). Los espermatozoides dentro de la luz del epidídimo parecen desordenados o en corrientes, a veces como remolinos, sin embargo, en tridimensión son avenidas que aseguran que los espermatozoides entren en contacto con la superficie ciliada de las células principales. Magnificación: A=25X; B=10X

3.4 Avances en la asociación de espermatozoides: Asociación de espermatozoides durante el tránsito epididimario: ¿una etapa en la maduración?

María de los Ángeles Monclús

En varias especies de mamíferos los espermatozoides se asocian como consecuencia del tránsito epididimario, es decir, la interacción de espermatozoides entre sí se observa solo a partir de la región del cuerpo del epidídimo (Simeone y col., 1931; Fawcett y col., 1963; Martan y col., 1973; Yanagimachi y col., 1976; Martan 1970; Heath y col., 1987; Briz y col., 1995; Fornés y col., 1990 y 1994; Monclús y col., 2007 y 2010). Esto sugiere una relación estrecha entre la asociación de espermatozoides entre sí y la maduración epididimaria. Hasta el momento, el significado biológico de estas interacciones no ha sido esclarecido ya que en la mayoría de los casos, una vez liberados al tracto reproductor femenino estas asociaciones de espermatozoides se desensamblan dando lugar a la liberación de espermatozoides no asociados. Se han hecho muchas especulaciones al respecto: en cobayo las uniones que se establecen entre las membranas de los espermatozoides que forman los Rouleaux podrían proveer un direccionamiento en los eventos de fusión de membranas en la reacción acrosomal (Flaherty y col., 1991). También se ha postulado que la formación de Rouleaux preserva la viabilidad espermática y previene una posible reacción acrosomal prematura (Tung y col., 1980). Otros autores especulan acerca de la implicancia de las asociaciones de espermatozoides en las estrategias reproductivas masculinas. En algunas especies en las cuales las hembras exhiben un comportamiento “promiscuo”, la asociación de espermatozoides de cada macho entre sí les confiere mayores chances de fecundación

que los espermatozoides aislados, en el caso de que más de un macho copulara con la misma hembra (Cooper y col., 2010; Pizzari y col., 2008; Foster y col., 2010). Un ejemplo interesante es el ratón *Apodemus sylvaticus*. En esta especie, los espermatozoides conforman un “tren” de espermatozoides que se desplaza a mayor velocidad que los espermatozoides aislados (Moore y col., 2002). Este autor sugiere que este comportamiento es altruista, dado que cada espermatozoide colabora con los demás para llegar a fecundar el ovocito, aunque comprometa su propia capacidad fecundante. No se ha logrado hasta el momento un consenso entre los distintos trabajos respecto a la definición de “asociación de espermatozoides”, ni se ha podido establecer una denominación única en las distintas especies de mamíferos, lo cual ha dificultado el estudio comparativo de este fenómeno. Desde los clásicos Rouleaux en Guinea pig hasta los trabajos más recientes en rata, ratón y echidna (Djakiew y col., 1983) los autores se han enfocado principalmente en realizar una descripción morfológica detallada de este fenómeno. Sin embargo, se han llevado a cabo algunas aproximaciones tendientes a caracterizar la naturaleza del material presente entre cabezas de espermatozoides que los mantendría asociados. En una publicación reciente, y basándonos en trabajos previos que describieron el aspecto de las Rosetas en los segmentos distales del epidídimo de la rata, consideramos que los espermatozoides durante su tránsito deben tomar contacto con un factor (o factores) presente/s en el lumen caudal para asociarse el uno al otro. Mediante ensayos *in vitro* intentamos recrear el fenómeno de asociación de espermatozoides en Rosetas que se verifica *in vivo* en el lumen epididimario. La experiencia consistió en co incubar espermatozoides no asociados extraídos de la cola del epidídimo con varias fracciones de proteínas obtenidas del fluido epididimario caudal. Luego de establecer la fracción más activa en cuanto a su

capacidad de re asociar espermatozoides, las proteínas presentes fueron caracterizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Entre las proteínas identificadas encontramos dos miembros de la familia de inhibidores serin proteasas (SERPINAS): Alfa -1 Antitripsina y una nueva proteína con un dominio tipo Alfa -1 Antitripsina que incluye una secuencia compatible con el centro reactivo característico de esta familia proteica. Estas serpinas podrían desempeñar un papel en el proceso de ensamble/desensamble de las Rosetas porque modulan de este modo la actividad de proteasas presentes en el lumen. Al respecto existen antecedentes previos (Cesari y col.,2010) en los que las Serina proteasas juegan papeles claves en muchos procesos relacionados con la fertilización, pero hasta el momento no ha podido establecerse inequívocamente la relación "una sola enzima- un único proceso". Esto podría deberse a que los espermatozoides tienen múltiples serin proteasas, reguladas a su vez por múltiples inhibidores como un mecanismo para asegurar el éxito de fertilización.

Referencias

- Briz M.D., Bonet S., Pinart B., Egozcue J., Camps R. (1995). "Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis". *J Androl.* 16, 2, 175-88.
- Cesari A., Monclus M.A., Tejón G.P., Clementi M.A., Fornes M.W. (2010). "Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: there must be a role". *Theriogenology.* 74, 5, 699-711.
- Cohen D.J., Maldera J.A., Vasen G., Ernesto J.I., Muñoz M.W, Battistone MA, Cuasnicú, P S. "Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process". *J Androl.* , 32, 6, 672-8.
- Cooper T.G., Weydert S., Yeung C.H., Künzl C., Sachser N. (2000). "Maturation of epididymal spermatozoa in the nondomesticated guinea pigs *Cavia aperea* and *Galea musteloides*". *J Androl.* 2, 1, 154-63.
- Cooper, T.A. (2011) "The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility". *Asian Journal of Andrology*, 13, 130–138.
- Djakiew D., Jones R.C. (1983). "Sperm maturation, fluid transport, and secretion and absorption of protein in the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*". *J Reprod Fertil.*, 68, 2, 445-56.
- Fawcett D.W., Hollenberg R.D. (1963). "Changes in the acrosome of Guinea pigs spermatozoa during passage through the epididymis". *Zellforsch Mikrosk Anat*, 60, 276-292.
- Flaherty S.P., Olson G.E. (1991). "Ultrastructural analysis of the acrosome reaction in a population of single guinea pig sperm". *Anat. Rec.*, 229, 2, 186-94.
- Fornés M.W, Burgos M.H. (1990). "Sperm associations in the rat epididymis". *Microsc Electron Biol Cellular* 14, 115-130.
- Fornés M.W, De Rosas J.C. (1991). "Interactions between rat epididymal epithelium and spermatozoa". *Anat Rec.*, 231, 2, 193-200.

Fornés M.W., Barbieri A., Sosa M.A., Bertini F. (1991). "First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid". *Andrologia*, 5, 47-51.

Fornés M.W., Burgos M.H. (1994). "Epididymal glycoprotein involved in the rat sperm association". *Mol Reprod Develop.*, 38, 43-47.

Foster K.R., Pizzari T. (2010). "Cooperation: the secret society of sperm". *Curr Biol.*, 20, 7, R314-6.

Heath E., Schaeffer N., Meritt D.A. Jr, Jeyendran R.S. (1987). "Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*". *J Reprod Fertil.*, 79, 1, 153-8.

Martan J. (1969). "Epididymal histochemistry and physiology". *Biol Reprod suppl* 1, 134-154.

Martan J., Shepherd B.A. (1973). "Spermatozoa in rouleaux in the female guinea pig genital tract". *Anat Rec.*, 175, 626-630.

Monclus M.A., Cesari A., Cabrillana M.E., Saez Lancellotti T.E., Renzetti D.E., Clementi M.A., Boarelli P.V., Vincenti A.E., Fornés M.W. (2010). "Protein fraction isolated from epididymal fluid re-associates sperm in vitro: possible role of serpins in rat rosettes". *Mol Reprod Dev*, 77, 5, 410-9.

Monclus M.A., Cesari A., Cabrillana M.E., Boarelli P.V., Vincenti A.E., Burgos M.H. and Fornés M.W. (2007). "Mouse Sperm Rosette (MSR): assembling during epididymal transit, in vitro disassemble and oligosaccharides participation in the linkage material". *Anatomical Record.*, 290, 7, 814-24.

Moore H., Dvoráková K., Jenkins N., Breed W. (2002). "Exceptional sperm cooperation in the wood mouse". *Letters to Nature. Nature* 418, 174-177.

Oliveira C.A., Carnes K., França L.R., Hermo L., Hess R.A. (2005). "Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis". *Biol Cell.*, 97, 6, 385-95.

Pizzari T., Foster K.R. (2008). "Sperm sociality: cooperation, altruism, and spite". *PLoS Biol.*, 6, 5, e130.

Simeone F.A., Young W.C. (1931). "A study of the function of the epididymis. IV. The fate of non-ejaculated spermatozoa in the genital tract of the male guinea pig". *J Exp Biol.*, 8, 163-175.

Sullivan R., Frenette G., Girouard J. (2007). "Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit". *Asian J Androl.*, 9, 4, 483-91.

Sutovsky P., Moreno R., Ramalho-Santos J., Dominko J., Thompson W.E., Schatten, G. (2001). "A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis". *Journal of Cell Science* 114, 1665-1675.

Tung K.S., Okada A., Yanagimachi R. (1980). "Sperm autoantigens and fertilization. I. Effects of antisperm autoantibodies on Rouleaux formation, viability, and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa". *Biol Reprod.*, 23, 4, 877-86.

Yanagimachi R., Mahi C.A. (1976). "The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study in vivo". *J Reprod Fertil.*, 46, 1, 49-54.

Capítulo 4

Adquisición de la capacidad para fertilizar al ovocito

Andreina Cesari

Como ya hemos visto, el espermatozoide, al abandonar el testículo a través de los túbulos seminíferos, debe atravesar el epidídimo donde sufre un proceso de maduración. Ahora bien, estas células aún no son capaces de fertilizar un ovocito (denominado así porque en la mayoría de los mamíferos la gameta femenina es ovulada en un estadio de la ovogénesis denominado metafase II) sino que todavía requieren de cambios que suceden justo antes del encuentro entre las dos gametas. Esto se descubrió en el año 1951, cuando Chang y Austin (Eddy 2006) observaron que los espermatozoides eyaculados de varias especies de mamíferos no eran capaces de fertilizar ovocitos si no permanecían un tiempo en el tracto de la hembra durante el periodo previo a la ovulación. De sus observaciones dedujeron que los espermatozoides sufrían cambios en ese periodo que en su conjunto los denominaron “capacitación”.

La capacitación hoy puede ser definida como una suma de cambios que permiten al espermatozoide adquirir la capacidad de fertilizar al ovocito. Estos cambios pueden resumirse en una lista de reacciones en distintas partes de la célula espermática que vamos a detallar a continuación.

Los procesos asociados a la capacitación espermática pueden ser descritos de acuerdo a un número de criterios. Temporalmente, señales del medio extracelular se unen a receptores de la superficie y desencadenan eventos internos de señalización que culminan en dos procesos fisiológicos fundamentales: la reacción acrosomal y el cambio en el pa-

trón de movilidad del flagelo, o hiperactivación. Sin embargo, para que comience este proceso la superficie espermática es remodelada de modo tal que se exponen moléculas que no estaban disponibles en el espermatozoide eyaculado. Por este motivo vamos a clasificar los eventos que ocurren durante la capacitación en: a) cambios en la superficie espermática; b) cambios intracelulares, y c) cambios funcionales.

4.1 Cambios en la superficie espermática

Como ya hemos visto, durante el tránsito por el epidídimo, el espermatozoide adquiere moléculas en su superficie y posteriormente se adsorben allí también macromoléculas del fluido seminal. Probablemente, por un efecto de dilución, al ingresar en el tracto de la hembra se produce la desorción de estas moléculas y, como consecuencia, se exponen nuevas moléculas de superficie y se activan enzimas que estaban inactivas por unión con ligandos de efecto inhibitorio. Este efecto puede lograrse también *in vitro* por la eliminación del plasma seminal y posterior incubación de espermatozoides en un medio conteniendo moléculas con efecto “capacitante” (seroalbumina bovina, bicarbonato, etc.).

Por otro lado, la composición lipídica de la membrana plasmática cambia durante la capacitación. La membrana de los espermatozoides, como ya hemos visto, está constituida por colesterol y fosfolípidos. Cuanto más alta es la concentración relativa de los fosfolípidos respecto del colesterol, más fluida es la membrana. Previo a la capacitación el colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador de la bicapa. En el espermatozoide eyaculado la cara externa de la membrana plasmática está enriquecida en esfingomielina y fosfatidilcolina, y la cara intracelular contiene esencialmente fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina,

siendo esta asimetría mantenida por tres enzimas denominadas flipasa, flopasa y escramblasa. Durante la capacitación, la distribución asimétrica de los fosfolípidos colapsa y se ha descrito que se expone fosfatidilserina que puede ser detectada por medio de Annexina-V (Kotwicka y col. 2002).

Se ha observado que la adición de HCO_3^- a niveles similares a los que se encuentran en el tracto de la hembra resulta en la pérdida de la asimetría y consecuentemente, el egreso de colesterol. No se conoce exactamente cuál es la función de esta pérdida de colesterol, sin embargo, para que la que capacitación ocurra *in vitro*, es necesaria la presencia de moléculas aceptoras de colesterol como BSA, ciclodextrinas o lipoproteínas de alta densidad (Florman y Ducibella 2006). A su vez, la concentración de colesterol y la exposición de fosfatidilserina varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en microdominios ubicados en la región del acrosoma (Cross 1998), por lo que se supone que el eflujo de colesterol puede estar relacionado con la relocalización o cambio conformacional de proteínas receptoras que regulan cascadas de señalización. Sin embargo, algunos trabajos muestran que en estos microdominios el eflujo de colesterol no se produce (Boerke y col. 2008).

Por el otro lado, la membrana espermática en los mamíferos se encuentra polarizada a causa de la diferencia en la concentración iónica intra y extracelular que se mantiene por la presencia de transportadores y canales iónicos presentes en la célula (Visconti y col. 2011). Esta polaridad se altera durante la capacitación, aumentando 30 Unidades respecto de un potencial en reposo de 235-245 mV cuando se incuban los espermatozoides en un medio capacitante *in vitro* debido a un aumento en la permeabilidad al K^+ , elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular y disminución en la concentración de Na^+ intracelular (De La Vega-Beltran y col. 2012).

4.2 Cambios intracelulares

Los cambios en el interior de la célula se pueden dividir en eventos tempranos y tardíos, siendo ambos parte de una cascada de transducción de señales cuyos segundos mensajeros son objeto de intensa investigación en los últimos años.

Al inicio de la capacitación, ingresa HCO_3^- , al espermatozoide por medio del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ lo que produce un aumento del pH intracelular (mayor a 0.3 unidades). Es importante señalar que la concentración de HCO_3^- es baja en el epidídimo y alta en el plasma seminal y el oviducto (Travis y col. 2001). El aumento en la concentración de HCO_3^- activa la adenilato ciclasa soluble (ACS), provocando una subida de cAMP y, consecuentemente, la activación de la proteína quinasa A (pKA), quien inicia una cascada de fosforilaciones que culmina con la típica fosforilación de varias proteínas en residuos tirosina (Salicioni y col. 2007).

Por otro lado, se produce un ingreso de Ca^{+2} desde el medio extracelular a través de distintos tipos de canales específicos regulados por los cambios de voltaje de la membrana plasmática o por ligandos específicos (progesterona, proteínas de la zona pelucida, etc.). Este ingreso transitorio de calcio es en sí mismo una señal que prepara a la célula para los dos eventos mencionados: hiperactivación y reacción acrosomal.

Por otro lado, se ha reportado un incremento de óxido nítrico (NO) en espermatozoides de varios mamíferos durante la capacitación (Zalazar y col. 2012; Revelli y col. 2002). Este aumento provocado por la actividad de alguna de las isoformas de la Nitrato sintasa (NOS) se ha asociado al activación de una guanilato ciclasa de membrana (GCm); si bien el rol del cGMP en espermatozoides aún no está esclarecido aunque algunos autores han propuesto que existe un *cross-talk* entre cAMP y cGMP (Revelli y col. 2002). Estos eventos intracelulares se resumen en la Fig. 1.

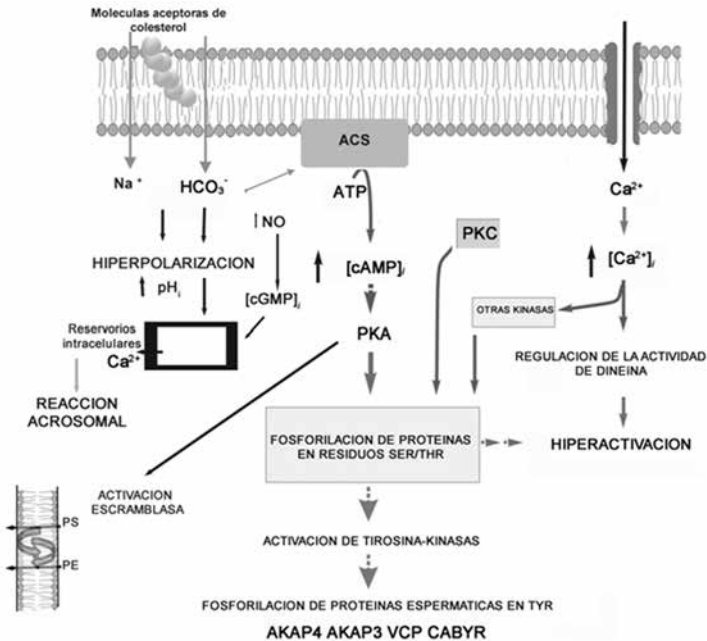


Figura 1. Cambios de membrana e intracelulares que ocurren durante la capacitación espermática. Basado en trabajos de distintos autores (Visconti y col. 2011; Witte y col. 2007; Salicioni y col. 2007) se pueden resumir estos cambios de la siguiente forma: en presencia de moléculas aceptoras de colesterol (BSA, metilciclodextrina) sale colesterol de la membrana plasmática, ingresa HCO_3^- y Na^+ provocando hiperpolarización de la membrana y aumento de pH intracelular. A su vez esto activa la adenilato ciclasa soluble (ACS) que induce la activación de proteína quinasa A (PKA) quien produce fosforilación de proteínas en ser/thr y otras quinasas, que luego provocan la activación de tirosina-quinasas con la consecuente fosforilación de proteínas en tirosina. La PKA a su vez activa la escramblasa que induce cambios en la bicapa lipídica facilitando la salida de colesterol. El cambio en la membrana permite el ingreso de Ca^{2+} que participa en la activación de las quinasas y en la activación del flagelo para la hiperactivación. Otro efecto de la hiperpolarización de la membrana es la activación de la salida de Ca^{2+} de reservorios internos preparando a la célula para responder a los inductores naturales de la reacción acrosomal, la cual a su vez se induce por el aumento en la concentración de cGMP en respuesta a un aumento de óxido nítrico (NO) que ocurre durante la capacitación, probablemente debido al aumento de calcio intracelular que activa las óxido nítrico sintasas calcio dependientes.

4.3 Cambios funcionales

Hiperactivación: Cuando se incuban espermatozoides epididimarios o eyaculados pero depletados de plasma seminal de mamíferos en un medio isotónico no capacitante (es decir sin BSA y sin bicarbonato) la mayoría de las células baten sus flagelos de manera simétrica provocando un nado recto progresivo. Sin embargo, luego de un periodo en medio capacitante o en espermatozoides extraídos del oviducto se produce un aumento en la frecuencia del movimiento y flexión del flagelo, gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza describiendo una trayectoria curva y tortuosa, que es característica de cada especie (Florman y Ducibella 2006) (Fig. 2).

Este cambio en el patrón de movimiento otorga al espermatozoide la capacidad mecánica de atravesar medios viscosos como el mucus del oviducto y la zona pelucida del ovocito, además de permitirle liberarse de la adhesión transitoria al epitelio del oviducto, seleccionando de alguna forma la población que llegara finalmente al ovocito para la fertilización.

Reacción acrosomal: Se trata de un evento excitotico mediado por señales específicas en el que el espermatozoide pierde la membrana mas externa de la vesícula acrosomal, en la región apical de la cabeza (Fig. 2). A nivel celular reacción acrosomal se ha caracterizado al microscopio electrónico en cinco etapas (Gadella 2008):

Etapas 1) Acrosoma, membrana acrosomal externa y plasmática intactas, matriz acrosomal homogénea y compacta.

Etapas 2) Hinchamiento de la matriz acrosomal.

Etapas 3) Formación de vesículas dentro del capuchón acrosomal por la fusión en múltiples puntos entre la

membrana acrosomal externa y la membrana plasmática.

Etapa 4) Pérdida de la matriz acrosomal.

Etapa 5) Pérdida de las membranas plasmática y acrosomal externa en la región apical y exposición de regiones de la membrana en la zona ecuatorial.

Bioquímicamente la reacción acrosomal se caracteriza por la activación y liberación de las enzimas acrosomales, muchas de las cuales son enzimas líticas que contribuyen en la penetración del ovocito. Si bien se ha demostrado que la reacción acrosomal es un pre-requisito para la fusión del espermatozoide con el ovocito, probablemente debido a la exposición de dominios de la superficie espermática claves para la interacción con el ovocito, el lugar específico en el que ocurre la reacción acrosomal depende de la especie. Recientemente, en ratones se ha demostrado que la exocitosis del acrosoma ocurre previamente a la unión con la zona pelúcida del ovocito (Hirohashi y col. 2011).

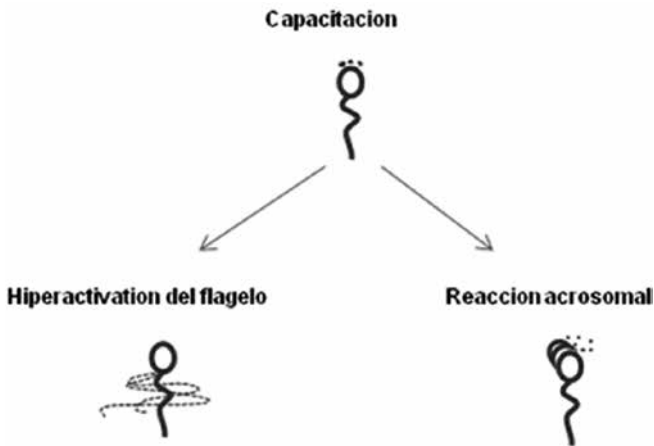


Figura 2. Representación esquemática de los cambios desencadenados a partir de la capacitación espermática.

4.4 Avances en el estudio de inhibidores de serina proteasas que regulan la fisiología espermática

Lucia Zalazar

Existen dos factores importantes que determinan el potencial reproductivo del macho en la mayoría de los mamíferos: la eficiencia de la espermatogénesis y el funcionamiento de las glándulas accesorias, las cuales, como ya se ha mencionado, secretan sus componentes al plasma seminal. Se tiene evidencia de que el balance estequiométrico entre serina proteasas e inhibidores en este medio determina la ocurrencia de dos procesos fisiológicos importantes: la maduración y la capacitación espermática, eventos necesarios para la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide (Cesari y col. 2010).

Las serina proteasas forman parte del grupo de proteasas que más recientemente se ha caracterizado y es la familia proteolítica más grande. Su nombre se debe al residuo serina en el centro activo. La familia está dividida a su vez en: proteasas de tipo quimotripsina (incluyendo tripsina y quimotripsina), subtilasas, carboxipeptidasas y proteasas Clp. Estas proteasas actúan en forma secuencial y programada promoviendo la maduración y capacitación de la gameta masculina de modo que asegure el éxito en la fertilización del ovocito a través de mecanismos moleculares poco conocidos. La acción de proteasas debe ser regulada para que su actividad sea adecuada en intensidad, lugar y tiempo. Este fenómeno de regulación es llevado a cabo por inhibidores o activadores que aún se encuentran parcialmente caracterizados, molecular y funcionalmente.

Una vez que abandonan el testículo, los espermatozoides se asocian durante el tránsito epididimario completando

la maduración y almacenamiento. En este proceso las células adquieren proteínas en su superficie provenientes del fluido epididimario que forman asociaciones proteína-proteína muy estables, en las cuales participan glico-proteínas que adhieren las cabezas espermáticas, proteínas con dominios de fibronectina, serina proteasas e inhibidores de tipo Serpina o Kunitz (Monclus y col. 2007). Más tarde, en contacto con el plasma seminal, el espermatozoide sigue incorporando moléculas provenientes de glándulas accesorias en su superficie, estabilizando las membranas y manteniendo la célula en estado decapitado.

Durante la capacitación espermática en el tracto reproductor de la hembra, se desensamblan las asociaciones y los espermatozoides pierden gran parte de las proteínas adheridas a su superficie, lo cual podría estar mediado por serina proteasas (extracelulares o asociadas a la membrana plasmática) e inhibidores. Por otra parte, en el momento en el que los espermatozoides sufren la reacción acrosomal se liberan proteasas acrosomales, que participan en la lisis de la zona pelúcida permitiendo la fusión con el ovocito (fertilización). Estos eventos descritos aseguran el éxito de la fertilización y requieren que las serina proteasas participantes sean reguladas adecuadamente.

Así, la existencia de inhibidores de serina proteasas presentes en el plasma seminal y en las glándulas sexuales masculinas ha sido reportada en muchas especies de mamíferos (Cesari y col. 2010; Cechova y Jonakova 1981). Sin embargo, aun cuando las serina proteasas están ampliamente distribuidas en la cabeza del espermatozoide y se ha demostrado que la fertilización se inhibe en presencia de inhibidores de serina proteasas exógenos, las bases moleculares de esta regulación no han sido del todo elucidadas. Se conoce parcialmente la relación entre la actividad inhibitoria de proteasas y la regulación de algunos procesos fisiológicos que

ocurren en el espermatozoide como la capacitación, hiperactivación del flagelo y la reacción acrosomal, procesos como ya se ha mencionado, desencadenados principalmente por la entrada de Ca^{+2} y HCO_3^- dentro de la gameta.

Los inhibidores de serina proteasas se encuentran clasificados en la actualidad dentro de cuarenta y un familias de inhibidores, según la similitud en la secuencia de aminoácidos entre los miembros de una misma familia. Las familias de inhibidores: I1 (Kazal), I2 (Kunitz) e I4 (serpinas), están representadas por un gran número de inhibidores y muchos de sus miembros estarían asociados a la regulación de la fertilización. Mediante otra clasificación los inhibidores de serina proteasas se dividen en tres grandes grupos: inhibidores canónicos, no canónicos e inhibidores de tipo serpina. Esta clasificación depende de su mecanismo de acción y de su homología estructural (dominios característicos) con proteínas ya caracterizadas. Un rasgo característico en los inhibidores de serina proteasa es que son péptidos de bajo peso molecular (3-21 kDa) ricos en puentes disulfuro, con excepción de las serpinas que pertenecen a un grupo de inhibidores cuyas masas están entre los 35 y 50 kDa. Hasta hace unos años se especulaba que los inhibidores de proteasas eran específicos para uno solo de los cuatro tipos de mecanismos de proteólisis que existen de proteasas (serina, cisteína, aspartil o metaloproteasas). Sin embargo, aunque se conocen de estos ejemplos, existen en la actualidad múltiples casos de proteínas que son capaces de inhibir varios tipos de proteasas.

Los primeros estudios sobre inhibidores de serina proteasas en espermatozoides surgieron a partir del estudio de la serina proteasa acrosomal: acrosina. Se creía que la actividad proteolítica descrita para esta proteasa le permitía al espermatozoide unirse y penetrar la zona pelúcida del ovocito. Los primeros inhibidores de acrosina descritos correspondían a polipéptidos secretados desde la vesícula seminal

estructuralmente similares a inhibidores de la familia I1 que interactuaban con la proteasa de una forma sustrato-reversible. Estos péptidos han sido localizados en la membrana acrosomal externa y solubles en el fluido epididimario y el plasma seminal (Cesari y col. 2010). Luego se identificaron SPINK2 y SERPINA5 (PCI) como inhibidores de acrosina. El primero es un inhibidor de tipo Kazal que inhibe tripsina/acrosina (I1) y es sintetizado principalmente en vesícula seminal y testículo. Esta proteína ha sido reportada en humano, ratón, rata, mono, entre los más importantes y predicha en bovino (Cesari y col. 2010). Recientemente se demostró que ratones mutantes con niveles de SPINK2 disminuidos exhibían alteraciones en la fertilidad y en la integridad del testículo afectando la espermatogénesis (reducción en el número de espermatozoides) y apoptosis de las células germinales acompañado por una elevada actividad de serina proteasas (Lee y col. 2011). El inhibidor SERPINA5 (SERPINA A5, PCI) que pertenece a la familia I4 se encuentra en el plasma seminal y se expresa en varios tejidos reproductivos como en testículo, epidídimo, próstata y principalmente en vesícula seminal (humanos y ratones) en dónde es activo. Una vez que se produce la eyaculación, SERPINA5 pierde su actividad al unirse e inhibir a activadores de plasminógeno (urokinase-type and tissue-type plasminogen activators) y al antígeno específico prostático (PSA o kallikreina 3). Así, este inhibidor está involucrado en la regulación de la licuefacción del semen. Por otro lado, también inhibe acrosina protegiendo los componentes del tracto reproductor de ser degradados por una liberación excesiva de esta proteasa (Uhrin 2000).

Por otra parte, otro inhibidor de serina proteasas muy similar a SERPINA5 que fue encontrado en el acrosoma es NEXIN (serpin 1 o plasminogen activator inhibitor-1), el cual también pertenece a la familia de las serpinas (familia I4). Se expresa en vesícula seminal de ratones adultos y se ha repor-

tado también en humanos, bovinos y ratas. Se ha demostrado que el silenciamiento tanto del gen de SerpinA5 como de Nexina produce infertilidad, sugiriendo que estos inhibidores de serina proteasas estarían involucrados en algunas de las etapas de la reproducción incluyendo las del proceso de fertilización (Cesari y col. 2010).

Otro miembro de la familia de las serpinas, HongrES1, fue reportado en epidídimo de rata y cobayo. HongrES1 actuaría como un factor decapacitante ya que por un lado se vio que al regular negativamente su expresión mediante ARNi, el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó significativamente, aunque en ensayos *in vivo* se redujo la fertilidad acompañado por alteraciones fenotípicas en fetos y crías. Por otro lado, se reportó que prevendría la entrada de calcio al espermatozoide desde el medio extracelular (Ni y col. 2009). Un inhibidor de tipo serpinas que también forma complejos estables de inhibición con proteasas de tipo tripsina es SPI3/SERPINB6. El mismo fue encontrado en testículo principalmente en células germinales de ratón (Charron y col. 2006).

La familia Kunitz también está representada en el tracto reproductor masculino. En testículo (humano, ratón y rata), se ha encontrado al inhibidor de serina proteasas de tipo Kunitz (familia I2) SPINT2 (Odet y col. 2006).

El inhibidor de serina proteasas epididimario, EPPIN (SPINLW1) pertenece tanto a la familia de inhibidores de tipo Kunitz (I2) como de tipo WAP (I17) por poseer dos dominios. EPPIN se expresa bajo regulación androgénica en epidídimo y testículo (en humano, ratón y mono principalmente). En el eyaculado humano se lo encuentra formando un complejo macromolecular de unión a la cabeza del espermatozoide compuesto a su vez por lactotransferrina, clasterina y semengolina (SEMG1). EPPIN es el componente central de este complejo, por lo que este inhibidor tendría un rol fisiológi-

co tanto en la defensa antimicrobiana, en la inhibición de la actividad proteolítica de PSA y la modulación de la unión a SEMG1 (O'Rand y Widgren 2012).

En cuanto a inhibidores de serina proteasas pertenecientes de familia Kazal (I1) de importancia para la regulación de procesos asociados a la fertilización, además de SPINK2 ya mencionado, se conoce la existencia de otros inhibidores (Cesari y col. 2010) entre los más destacados: SPINK3 (vesícula seminal de rata y ratón), SPINK8 (epidídimo de ratón y humano), SPINK10 (epidídimo de ratón), SPINK11 (epidídimo y vesícula seminal de ratón), SPINK12 (epidídimo de ratón), SPINK9 (testículo humano), SPARC (secreted acidic cysteine rich glycoprotein, testículo de ratón) y FSTL (Follistatin-like 1, epidídimo de humano, ratón, rata y bovino).

Mediante dos aproximaciones experimentales --electroforesis bidimensional y cromatografía de afinidad tripsina-agarosa- nuestro grupo reportó la presencia de SPINK3 en vesícula seminal de ratón. Se trata de un inhibidor que se expresa en vesícula seminal bajo regulación androgénica pero es constitutivo en páncreas. Además de poseer características que definen a SPINK3 como un inhibidor de serina proteasas de tipo tripsina, se une a la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides (Fig. 3). El mismo es considerado un factor decapacitante ya que inhibe la incorporación de aproximadamente entre 30% y 50% del Ca^{+2} extracelular (Zalazar y col. 2012; Coronel y col. 1992), si bien aún no se conoce ni el mecanismo mediante el cual regula la entrada de calcio al espermatozoide ni cuál es la proteína blanco de este inhibidor.

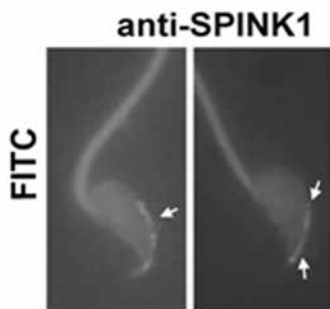


Figura 3. Inmunolocalización de SPINK3 unido a la cabeza del espermatozoide. (Tomada de Zalazar y col. 2012)

Algunos trabajos han señalado que los inhibidores de serina proteasas del tracto reproductor del macho, como es el caso de SPINK3, se unen a los espermatozoides durante la eyaculación y son removidos de la superficie espermática durante la capacitación que ocurre en el tracto reproductor de la hembra (Ou y col. 2012). SPINK3 disminuye el porcentaje de células que experimenta reacción acrosomal dada la inhibición de la entrada de calcio y altera el patrón de proteínas fosforiladas en residuos tirosina, evento involucrado en la capacitación del espermatozoide, sin embargo la actividad inhibitoria de tipo tripsina de este inhibidor sería independiente de los efectos que tiene sobre la reacción acrosomal y la capacitación. Por otra parte, nuestro grupo demostró que los procesos fisiológicos en los que está involucrado SPINK3 se regulan a través de una reducción del óxido nítrico endógeno (Zalazar y col. 2012). Por otra metodología (empleando un marcador que se fija a proteínas acrosomales del espermatozoide y fluoresce en presencia de calcio), recientemente se reportó que SPINK3 no afectaría la capacitación espermática (Ou y col. 2012).

Así, SPINK3, secretada desde la vesícula seminal, es considerada en la actualidad una proteína multifuncional ya que tiene dos actividades reportadas. Por un lado, la actividad inhibitoria de serina proteasa, la cual aún no ha sido bien caracterizada ni se conoce la proteína blanco sobre la que SPINK3 estaría actuando. Por otro, la actividad de tipo caltrin (calcium uptake inhibitor) que podría considerarse un importante punto de regulación en las cascadas de señalización espermática manteniendo al espermatozoide en un estado latente hasta el momento de la reacción con el ovocito (Fig. 4).

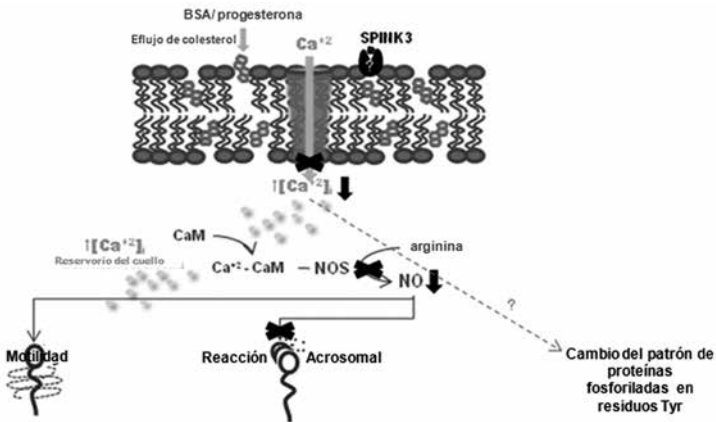


Figura 4. Esquema que representa el efecto del inhibidor SPINK3 sobre la fisiología del espermatozoide. El eflujo de colesterol de la membrana del espermatozoide (mediado por BSA o progesterona) promueve cascadas de señalización. La unión de SPINK3 a la superficie espermática reduce la entrada de Ca^{2+} disminuyendo la actividad de la oxido nítrico sintasa (NOS) calcio-dependiente, y provocando la reducción de la concentración del oxido nítrico (NO). Bajo condiciones capacitantes, la presencia de SPINK3 produce una reducción en el porcentaje de células que sufren reacción acrosomal, y un cambio en el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina, eventos que puede ser suprimidos por la adición directa de donantes de NO. La adición de SPINK3 no tiene efectos sobre la motilidad espermática sugiriendo que las vías de señalización son distintas.

Reconocimiento: Parte de la investigación de nuestro laboratorio ha sido financiada por los proyectos PIP 273/11, PICT 2155/11 y EXA 566/12

Referencias

Boerke, A.; Tsai, P.S.; Garcia-Gil, N.; Brewis, I.A.; Gadella, B.M. (2008). "Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction". *Theriogenology*, 70(8), 1188-96.

Cechova, D. y Jonakova, V. (1981). "Bull seminal plasma proteinase inhibitors". *Methods in Enzymol.* 80, 729-803.

Cesari, A.; Monclus, M de L.; Tejón, G.P.; Clementi, M.; Fornes, M.W. (2010). "Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: there must be a role". *Theriogenology*. 74(5), 699-711.

Charron, Y.; Madani, R.; Nef, S.; Combepine, C.; Govin, J.; Khochbin, S.; Vassalli, J.D. (2006). "Expression of serpinb6 serpins in germ and somatic cells of mouse gonads". *Mol Reprod Dev.* 73(1), 9-19.

Coronel, C.E.; Winnica, D.E.; Novella, M.L. (1992). "Purification, structure, and characterization of caltrin proteases from seminal vesicle of the rat and mouse". *J Biol Chem.* 267, 20909-20915.

Cross, N.L. (1998). "Role of Cholesterol in Sperm Capacitation". *Biol Reprod.* 59, 7-11

De La Vega-Beltran, J.L.; Sánchez-Cárdenas, C.; Krapf, D.; Hernandez-González, E.O.; Wertheimer, E.; Treviño, C.L.; Visconti, P.E.; Darazon, A. (2012). "Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction". *J Biol Chem.* 287 (53), 44384-93.

Eddy, E.M. (2006) "The spermatozoon". In: Neill, JD. editor. *Physiology of Reproduction*. 1-54.

Florman, H. y Ducibella, T. (2006) "Fertilization in Mammals". In: Neill JD, editor. *Physiology of Reproduction*. 55-112.

Gadella, B.M. (2008). "Sperm membrane physiology and relevance for fertilization". *Anim Reprod Sci.* 107(3-4), 229-36.

Hirohashi, N.; Gerton, G.L.; Buffone, M.G. (2011). "Video imaging of the sperm acrosome reaction during in vitro fertilization". *Commun Integr Biol.* 4(4), 471-6.

Kotwicka, M.; Jendraszak, M.; Warchoń, J.B. (2002). "Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa". *Folia Histochem Cytobiol.* 40(2), 111-2.

Lee, B.; Park, I.; Jin, S.; Choi, H.; Kwon, J.T.; Kim, J.; Jeong, J.; Cho, B.N.; Eddy, E.M.; Cho, C. (2011). "Impaired spermatogenesis and fertility in mice carrying a mutation in the Spink2 gene expressed predominantly in testes". *J Biol Chem.* 286(33), 29108-17.

Monclus, M.A.; Cesari, A.; Cabrillana, M.E.; Boarelli, P.V.; Vincenti, A.E.; Burgos, M.H.; Fornés, M.W. (2007). "Mouse Sperm Rosette (MSR): assembling during epididymal transit, in vitro disassemble and oligosaccharides participation in the linkage material". *Anatomical Record.* 290(7), 814-24.

Ni, Y.; Zhou, Y.; Chen, W.Y.; Zheng, M.; Yu, J.; Li, C.; Zhang, Y.; Shi, Q.X. (2009). "HongrES1, a cauda epididymis-specific protein, is involved in capacitation of guinea pig sperm". *Mol Reprod Dev.* 76(10), 984-93.

Odet, F.; Verot, A.; Le Magueresse-Battistoni, B. (2006). "The mouse testis is the source of various serine proteases and serine protease inhibitors (SERPINs): Serine proteases and SERPINs identified in Leydig cells are under gonadotropin regulation". *Endocrinology.* 147(9), 4374-83.

O'Rand, M.G.; Widgren, E.E. (2012). "Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor". *Biol Reprod.* 86(2), 55.

Ou, C.M.; Tang, J.B.; Huang, M.S.; Sudhakar Gandhi, P.S.; Geetha, S.; Li, S.H.; Chen, Y.H. (2012). "The mode of reproductive-derived

Spink (serine protease inhibitor Kazal-type) action in the modulation of mammalian sperm activity". *Int J Androl.* 35(1), 52-62

Revelli, A.; Ghigo, D.; Moffa, F.; Massobrio, M.; Tur-Kaspa, I. (2002). "Guanylate cyclase activity and sperm function". *Endocr Rev.* 23(4), 484-94.

Salicioni, A.M.; Platt, M.D.; Wertheimer, E.V.; Arcelay, E.; Allaire, A.; Sosnik, J.; Visconti, P.E. (2007). "Signalling pathways involved in sperm capacitation". *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65,245-59.

Travis, A.J.; Jorgez, C.J.; Merdiushev, T.; Jones, B.H.; Dess, D.M.; Diaz-Cueto, L.; Storey, B.T.; Kopf, G.S.; Moss, S.B. (2001). "Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa". *J Biol Chem.* 276(10), 7630–7636.

Uhrin, P.; Dewerchin, M.; Hilpert, M.; Chrenek, P.; Schöfer, C.; Zechmeister-Machhart, M.; Krönke, G.; Vales, A.; Carmeliet, P.; Binder, B.R.; Geiger, M. (2000). "Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility". *J Clin Invest.* 106(12), 1531-9.

Visconti, P.E.; Krapf, D.; de la Vega-Beltrán, J.L.; Acevedo, J.J.; Darazon, A. (2011). "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation". *Asian J Androl.* 13(3), 395-405.

Witte, T.S.; Schäfer-Somi, S. (2007). "Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa". *Anim Reprod Sci.* 102(3-4), 181-93.

Zalazar, L.; Saez Lancellotti, T.E.; Clementi, M.; Lombardo, C.; Lamattina, L.; De Castro R.; Fornés, M.W.; Cesari, A. (2012). "SPINK3 modulates mouse sperm physiology through the reduction of nitric oxide level independently of its trypsin inhibitory activity". *Reproduction.* 143(3), 281-95.

Capítulo 5

Ambiente del espermatozoide

Lucía Zalazar y Andreina Cesari

Como ya hemos visto, el estado fisiológico del espermatozoide se va modificando a medida que este atraviesa los distintos órganos principales y secundarios de conducto masculino y entra en contacto con sus productos de secreción.

Luego que el espermatozoide sale del epidídimo y entra en el conducto deferente hacia el tramo final donde será liberado como producto de la eyaculación, entra en contacto con nuevas secreciones que provienen de las glándulas accesorias. Estas secreciones conforman el fluido seminal que tiene gran importancia en la capacidad fertilizante de la gámeta masculina.

5.1 Glándulas anexas

Las glándulas sexuales accesorias no contienen ni transportan espermatozoides pero son de gran importancia para su funcionalidad. Las secreciones de estas glándulas constituyen un pool que conforma la mayor parte del plasma seminal rico en carbohidratos, sales de ácido cítrico, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y sustancias minerales con un poder tampón relativamente elevado. La mayor proporción del fluido seminal está conformada por las secreciones de la próstata y las vesículas seminales, con un aporte menor de las glándulas peri y bulbouretrales. De aquí que el plasma seminal constituye un medio líquido especialmente apto para el desarrollo de las funciones vitales

de los espermatozoides. Las glándulas anexas del aparato genital entran en actividad tras la aparición de la pubertad, tienen un desarrollo variable de acuerdo con la especie, son palpables, en parte, por vía rectal en animales mayores, y en los machos castrados son rudimentarias.

Las secreciones de estas glándulas se vierten a la uretra en el momento de la eyaculación gracias a la contracción de las fibras de músculo liso presentes en su paránquima y que están invadidas por el sistema nervioso vegetativo.

Si bien no todas las especies poseen todas las glándulas accesorias, la mayoría de las glándulas accesorias del macho se describen como túbulo-alveolares ramificadas o compuestas. Sin embargo, la variación estructural entre especies es muy grande. En los carnívoros, puede estar presente solo la próstata, la cual cumple con las funciones secretoras de todas las glándulas ausentes (Suarez 2006).

En el hombre se encuentran las vesículas seminales, la próstata, las glándulas bulbouretrales o de Cowper y las glándulas uretrales de Littre. En roedores, además, existen las glándulas coagulantes, ampulares y prepuciales (Rugh 1990).

5.1.1 Vesícula seminal

La vesícula seminal o glándulas vesiculares son dos estructuras en forma de saco, ubicadas en la cavidad pelviana sobre la superficie postero-inferior de la vejiga urinaria. Se caracterizan por sus estructuras tortuosas formadas por epitelio estratificado columnar y células cubicas ubicadas sobre la lamina basal (Fig. 1).

En el hombre, el desarrollo de las vesículas seminales comienza a las 12 semanas del desarrollo fetal a partir del mesonefro al igual que el epidídimo y el conducto deferente. La morfogénesis de las vesículas seminales es dependiente de los andrógenos testiculares, por lo que no hay un órgano homólogo en la mujer (Suarez 2006).

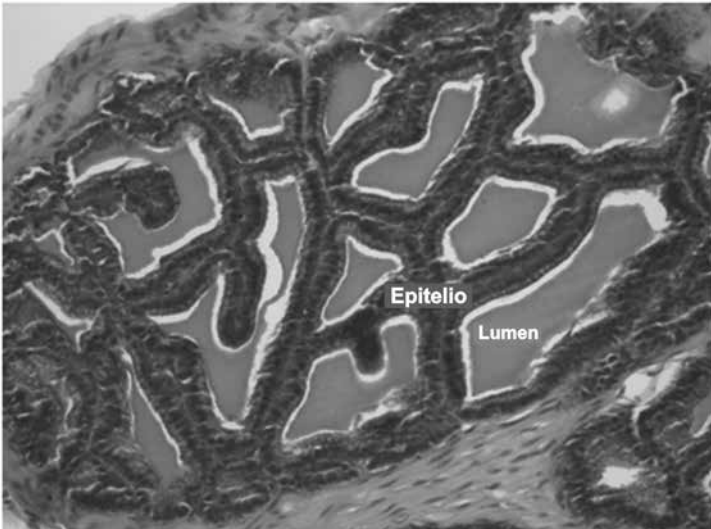


Figura 1. Histología de la vesícula seminal. Sección transversal de una vesícula seminal humana. Se muestra la región del lumen y el epitelio que contiene los gránulos secretorios. Magnificación= 400X. (Foto: F. Cifuentes Ph.D., LACyM).

Las vesículas seminales del individuo maduro se encuentran revestidas de epitelio secretor que produce un material mucoide rico en fructosa, proteínas y pequeñas cantidades de ácido ascórbico, inositol, ergotonina, aminoácidos, fosforilcolina y prostaglandinas. En medicina legal, tiene gran importancia el contenido de flavinas en la secreción de estas glándulas. Las flavinas son pigmentos fluorescentes que delatan la presencia de manchas de semen.

La morfología glandular y los productos de su secreción son dependientes de los niveles de testosterona. Su secreción participa en el volumen del eyaculado. Contiene células musculares lisas, que al contraerse durante la eyaculación vuelcan sus productos acumulados en el conducto

deferente (Suarez 2006).

Mediante un mecanismo secretor denominado “apócrino”, las vesículas seminales de algunas especies (conejo, toro, caballo) son responsables de la formación de partículas membranosas denominadas “vesiculosomas”, muy similares a los prostasomas (Aumüller y col. 1999).

En los rumiantes, las glándulas tienen aspecto compacto. En los equinos, en cambio, se observan estructuras saculares externas verdaderas y el conducto central está muy dilatado. En los roedores, la secreción de estas glándulas es rica en moco y contribuye a la formación del tapón vaginal. En todos los carnívoros, las glándulas vesiculares están ausentes.

5.1.2 Próstata

La próstata es una de las principales glándulas anexas o accesorias del tracto reproductor masculino (Fig. 2). Su presencia es común a todos los mamíferos, sin embargo, difiere en sus características anatómicas, histológicas, bioquímicas y funcionales entre las distintas especies. Su secreción constituye una fracción variable del volumen seminal y proporciona una serie de sustratos, iones y enzimas que son importantes para la sobrevivencia y función espermática. Dada su importancia, desarrollaremos este tema en un capítulo aparte (Capítulo 6).

5.1.3 Glándulas bulbouretrales o de Cowper

Estas glándulas están presentes en casi todos los mamíferos, con excepción de los caninos. En el desarrollo embrionario se originan a partir de proyecciones del sino urogenital que invaden el mesénquima adyacente de la uretra primitiva. Tiene un origen similar a la próstata y, al igual que

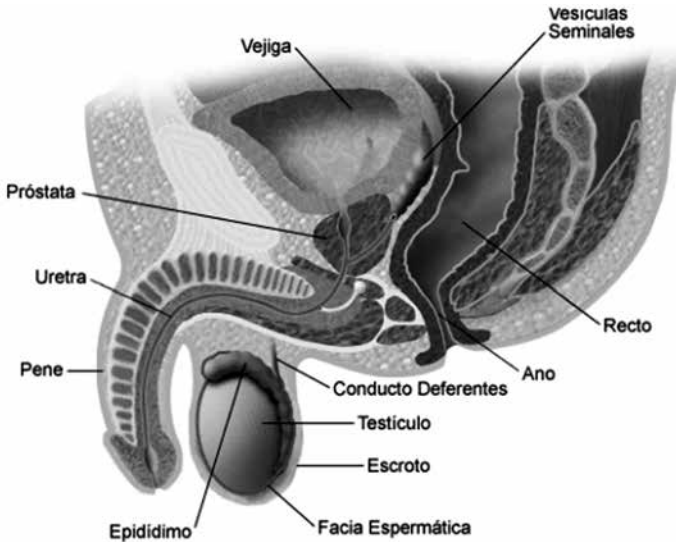


Figura 2. Esquema de tracto reproductor masculino mostrando la ubicación de la próstata y su relación con las demás estructuras. (Imagen tomada de internet:<http://urologiaperuana.blogspot.com/2011/06/cancer-de-prostata.html>)

ésta, se encuentra bajo el control de los andrógenos.

Una vez maduras, son glándulas ovoides y pares, de 2-3 cm de largo en el hombre. Sus secreciones son vaciadas en la uretra y continúan hacia el plasma seminal. En los roedores, se cree que son importantes en la formación del tapón mucoso luego de la copula. Están envueltas en el músculo bulbo-cavernoso y desembocan por separado en la uretra con la que se encuentran en contacto a la altura del estrecho posterior de la pelvis. Tienen una estructura lobulosa y los lóbulos se encuentran divididos por tabiques ricos en tejido conectivo. Su secreción tiene como función limpiar y lubricar la uretra antes de la cópula, con el objetivo de facilitar

el tránsito de los espermatozoides por este segmento que constituye una vía común de los sistemas genital y urinario.

Su desarrollo varía de acuerdo con la especie, siendo más voluminosas en el cerdo, mientras que en el caballo y el toro tienen aproximadamente el tamaño de una nuez, para disminuir proporcionalmente en pequeños rumiantes y en el gato, en tanto que están ausentes en el perro.

5.1.4 Glándulas uretrales de Littre

Son estructuras tubulares localizadas en las invaginaciones de la mucosa de la uretra. En la mujer, las glándulas homologas se denominan “Glándulas de Skene”, cuyo origen embrionario es similar al de la próstata.

Las glándulas de Littre están a su vez constituidas por dos tipos de glándulas: las intra mucosas, que son pequeñas, muy numerosas en la región cavernosa de la uretra y localizadas en la lámina propia; y las extra mucosas, de mayores dimensiones con conductos que suelen abrirse en la uretra formando ángulos agudos. Ambos tipos de glándulas segregan una sustancia mucoide que conjuntamente con la secreción de las glándulas de Cowper tienen la función de limpiar y lubricar la uretra antes del paso de los espermatozoides.

5.1.5 Glándulas Ampulares

La *ampulla* o ampolla del conducto deferente consiste en una zona engrosada de la porción distal de este conducto. El nombre “ampolla” es un tanto incorrecto por cuanto no hay una significativa dilatación de la luz central, si no un aumento del grosor de la pared, causada por una ampliación del espesor de la lámina propia submucosa, la cual adquiere estructuras descritas como glándulas túbulo-alveolares ramificadas, las cuales pueden tener aspecto sacular en los rumiantes.

Las glándulas ampulares secretan un líquido blanco lechoso similar al de las glándulas vesiculares, cuya función no es del todo clara. En los rumiantes, estas glándulas pueden actuar como reservorios de espermatozoides viables, por lo que se puede justificar una función nutritiva para las secreciones ampulares.

Existen variaciones entre especies: equinos, caninos y rumiantes tienen ampollas bien desarrolladas; en los cerdos el desarrollo es pobre y los felinos no la poseen.

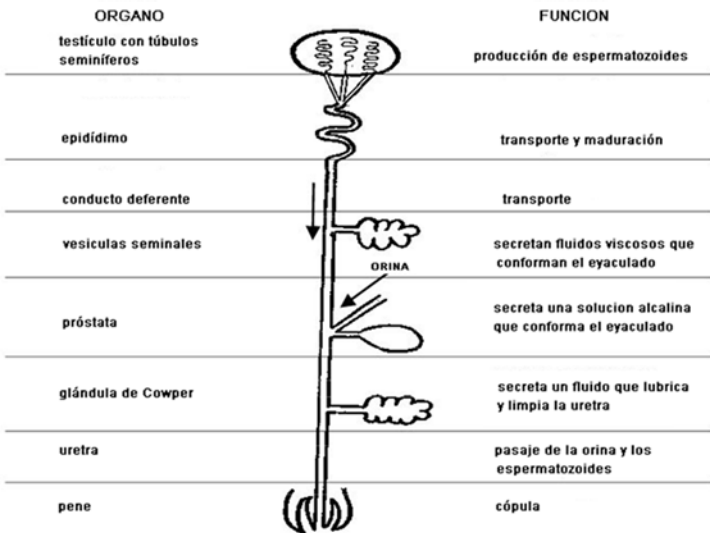


Figura 3. Representación esquemática de la ubicación y función de los órganos del tracto reproductor masculino en los mamíferos. La distribución de los órganos varía con la especie. (Adaptado de http://en.wikibooks.org/wiki/Anatomy_and_Physiology_of_Animals/Reproductive_System, consultado el 15 de junio de 2013).

5.2 Semen

5.2.1 Composición general del semen

El semen en humano es también conocido como fluido seminal y está compuesto en un 10% por espermatozoides y en un 90% por plasma seminal (PS). Este último en mamíferos contiene las secreciones provenientes de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbouretrales o de Cowper y glándulas uretrales), del epidídimo y del conducto deferente. En el caso de animales como rata, ratón, conejo, cobayo y mono, además, poseen la glándula de la coagulación que también libera sus secreciones al plasma seminal.

El plasma seminal está compuesto principalmente por un 75% de agua y solutos que constituyen un medio isotónico, cercano a la neutralidad, en el que la osmolaridad se mantiene gracias a componentes orgánicos. Si bien la composición exacta depende de la especie y, a la vez, ésta cambia luego de la eyaculación, se pueden encontrar electrolitos (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+}), proteínas, péptidos y aminoácidos, carbohidratos (principalmente fructosa), lípidos (fosfolípidos y colesterol) formando microvesículas, prostaglandinas, ácidos (cítrico, piruvico, ascórbico y úrico), carnitina y acetilcarnitina, adrenalina, dopamina, entre otros. Recientemente se reportó también la presencia de RNAs y micro-RNAs extracelulares que provienen de varios órganos del sistema reproductor masculino en concentraciones mayores a las reportadas para otros fluidos biológicos (1.75 mg/L) (Li y col. 2012), cuya función y origen no ha sido completamente elucidada.

5.2.2 Función del fluido seminal

El plasma seminal provee un medio nutritivo y protege a los espermatozoides durante el tránsito de estas gametas a través del tracto reproductor de la hembra: modula la respuesta inflamatoria tras la cópula (suprime la activación del sistema del complemento, la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y la fagocitosis) (Troedsson y col. 2005), sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los PMN que están presentes en el útero. El PS juega un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis 2006), participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática; además de servir como vehículo para los espermatozoides eyaculados (Muiño-Blanco y col. 2008). Dada la composición del semen el mismo tiene pH alcalino y por esta propiedad permite neutralizar el medio ácido (microflora propia que produce ácido láctico) de la uretra y la vagina de la hembra. Las aminas básicas, tales como putrescina, espermina, espermidina y cadaverina (mencionadas en detalle en la próxima sección) contrarrestan el ambiente ácido de la vagina, y protegen el ADN espermático de la posible desnaturalización ácida.

5.2.3 Aportes de órganos y glándulas accesorias al fluido seminal

El testículo de humanos aporta al fluido seminal aproximadamente entre 200 y 500 millones de espermatozoides. Mientras que la contribución de espermatozoides al plasma seminal en ratones es de 10-50, en la rata el eyaculado tiene entre 10-60 millones de espermatozoides por ml (Sherwood

1997, <http://www2.oakland.edu/biology/lindemann/spermfacts.htm> , consultado el 15 de junio de 2013,)

Las glándulas bulbouretrales y uretrales de mamíferos contribuyen al 3-6 % del contenido del semen (Fig. 4). Los compuestos provenientes de estas glándulas son la galactosa, ácido siálico, galactosamina, espermina, la cual tiene actividad antimicrobiana y el mucus, el cual favorece el tránsito de los espermatozoides a través de la vagina y el cérvix mediante la disminución de la viscosidad del tracto reproductor.

Por otro lado, el 25-30% del total del semen es aportado por la próstata (Fig. 4) y consta principalmente de las enzimas fibrinolisisina, pepsinógeno, lisozima, amilasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida y el ya mencionado antígeno específico de próstata (PSA), que está involucrado en la catálisis de la reacción bioquímica que provoca la licuefacción del semen coagulado. También forman parte del semen y son de origen prostático el ácido cítrico, fibrinógeno, iones calcio, magnesio y zinc (ayuda a estabilizar el ADN en las células espermáticas).

Por otra parte, los prostasomas son vesículas membranosas que son secretadas por las células epiteliales de la glándula prostática al plasma seminal mediante exocitosis o diacitosis (Ronquist y Brody 1985). Sus membranas lipoproteicas se caracterizan por tener una estructura muy ordenada y fuerte similar a los raft de membrana. Los prostasomas se fusionan a las células espermáticas en el medio ácido de la vagina de la hembra y modifica la composición de la membrana del espermatozoide. Estarían implicados en el aumento de la motilidad de los espermatozoides (Stegmayr y Ronquist 1982; Fabiani y col. 1994 y 1995), la licuefacción del semen (Carlini y col. 1997), la protección contra el ataque de las defensas inmunes de la hembra durante el trayecto del espermatozoide hacia el ovocito. Una amplia variedad de proteínas han sido encontradas en los prostasomas: enzi-

mas, proteínas estructurales y de transporte (actina, profilina y anexinas), proteínas asociadas a transducción de señales (calmodulina, ubiquitina), chaperonas, ATPasas (permiten el transporte de calcio hacia el interior de los prostasomas), proteína kinasa, fosfatasa, fosfodiesterasa, PSA, entre otras.

El aporte de la vesícula seminal al semen es del 60-75% de la composición total del fluido seminal (Fig. 4). Entre los componentes de mayor importancia se mencionan: aminoácidos, citrato, flavinas, vitamina C, fructosa, fosforilcolina, prostaglandinas, las cuales están involucradas en la supresión de la respuesta inmune desencadenada por la hembra cuando el semen atraviesa el tracto reproductor de la hembra (Remes Lenicov 2012). Las prostaglandinas también influyen sobre el tránsito de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino y femenino facilitando el movimiento de los espermatozoides, ayudando a la contracción del musculo liso del útero y disminuyendo la viscosidad del moco del cérvix; además de intervenir en la implantación del óvulo fertilizado. También forman parte del semen, proteínas provenientes de las vesículas seminales, muchas de las cuales se unen a la superficie espermática. Las proteínas secretadas por las vesículas seminales se pueden clasificar de acuerdo a su función en:

- Proteínas de transporte: transferrina lactoferrina, etc.
- Proteínas estructurales: semengolina y fribronectina
- Proteínas decapacitantes
- Proteínas inmunosupresoras: translutaminasa, lactoferrina, prostaglandinas
- Enzimas: anhidrasa carbonica, n-acetilglucosaminidasa, 5'-nucleotidasa, proteasas, fosfatasa, kinasas, serina proteasas
- Inhibidores de enzimas: inhibidores de proteasas
- Antioxidantes, que protegen al espermatozoide en el eyaculado de las especies reactivas de oxígeno

Además de las proteínas incluidas en esta clasificación, en ratones se han reportado proteínas secretorias de la vesícula (SVS I a VII), espermadhesinas (proteínas de unión a heparina) y proteínas que contienen dominios de fibronectina II, denominadas BSP (por Bovine Seminal Plasma donde se encontraron por primera vez). Estas últimas tienen la capacidad de interactuar con fosfatidilcolina de la superficie espermática, con lipoproteínas (de alta y baja densidad) y con heparina. Estas características les confieren a las BSPs la capacidad de participar en la desestabilización y la estabilización de la membrana espermática. Las BSP son ubicuas en el plasma seminal de mamíferos y están funcionalmente relacionadas con la capacitación. En cuanto a las espermadhesinas se conoce que interactúan con fosfatidiletanolamina de la membrana espermática, liberándose durante la capacitación, lo cual podría servir para el reconocimiento espermato-cito-ovocito.

Las secreciones provenientes de la vesícula seminal contribuyen a la funcionalidad de los espermatozoides, como es la coagulación del semen dentro de los primeros cinco minutos. La formación del coágulo ayuda a mantener al semen en la vagina. Luego el semen se licua formando un líquido viscoso (cinco a veinte minutos) y permite que los espermatozoides puedan avanzar hacia ovocito.

En el caso de los roedores, como ratas, ratones y cobayos, el plasma seminal cuenta además con secreciones proteicas de la glándula coagulante o lóbulo anterior de la próstata (estructura muy desarrollada en la rata) que está localizada en la parte ventral de las vesículas seminales y adosada a ellas. La misma secreta al semen principalmente dos proteínas, una de ellas una transglutaminasa conocida como vesiculasa (Groos y col., 1999). La importancia de esta proteína es que junto a otras proteínas de las secreciones provenientes de la vesícula seminal permite, al momento de

la expulsión del eyaculado, la coagulación del semen formando el ya mencionado tapón vaginal en la hembra, evitando el escurrimiento del semen por la misma, facilitando el pasaje de los espermatozoides a través del cérvix uterino y evitando que pueda ser fecundada por otro macho. Se ha demostrado una homología entre el lóbulo medio de la próstata en humanos y la glándula coagulante del ratón.

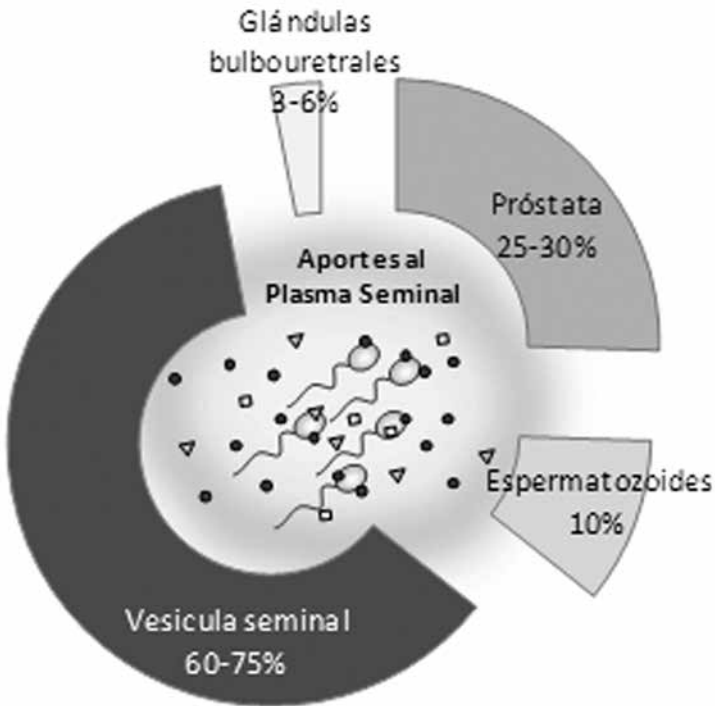


Figura 4. Aporte al plasma seminal de componentes provenientes de órganos y glándulas accesorias.

5.2.4 Características generales del eyaculado

El volumen promedio de semen de una eyaculación en humanos es de 1,5 a 5 mililitros. Cuando el volumen es constantemente menor a 1,5 ml se da una condición de hipospermia, y cuando es frecuentemente mayor a 5,5 ml la condición se conoce como hiperspermia. La variación en el volumen depende de la abstinencia sexual previa y del nivel de excitación durante la actividad sexual. El color del semen en los mamíferos en general es normalmente blancuzco o levemente amarillento, por las flavinas provenientes de la vesícula seminal.

Según la Organización Mundial de la Salud se considera normal a aquel semen humano que cumpla con los siguientes parámetros: volumen entre 2 ml a 5 ml, pH de 7.2 a 8.0, concentración mínima de espermatozoides de 15×10^6 espermatozoides/ml, es decir un total mayor a 40×10^6 espermatozoides por eyaculado, movilidad total mayor al 40% (motilidad progresiva + no progresiva), motilidad lineal progresiva de al menos el 32% (medido dentro de los 60 minutos tras haber colectado la muestra), y viabilidad (espermatozoides vivos) no inferior al 75%. Al menos el 58% de los espermatozoides debe mostrar una morfología normal. Niveles normales de fructosa son de alrededor de 13 μmol por muestra y la licuefacción completa del semen debe efectuarse dentro de los primeros 60 minutos.

Los factores que pueden causar infertilidad en el macho son: la baja calidad del semen (bajo número de espermatozoides, baja movilidad de los mismos, espermatozoides con morfología anormal), las anomalías estructurales (eyaculación retrógrada, bloqueo o extracción de los testículos u otras estructuras reproductivas pueden tener efecto negativo sobre la fertilidad), desequilibrios hormonales que podrían interferir con la producción de espermatozoides, trastornos genéticos, sedentarismo, diabetes, entre otros.

5.2.5 Avances en la utilización de plasma seminal para mejorar la calidad del semen congelado en especies de interés pecuario

Federico Andrés Hozbor y Alba Verónica Ledesma

En los últimos años, se ha prestado especial interés en la capacidad del plasma seminal (PS) para modular la aptitud fertilizante de los espermatozoides, y cómo se relacionan con los procesos asociados a la biotecnologías reproductivas. Uno de los problemas que se ha abordado, está relacionado con la sobrevivencia y funcionalidad de los espermatozoides luego de la congelación. Durante la criopreservación, las gametas masculinas deben enfrentar tres puntos críticos: 1) el descenso de temperatura, 2) el incremento en la osmolaridad de los medios intra y extracelulares, y 3) la formación y disolución de cristales de hielo (Watson 2000).

El primer obstáculo para el espermatozoide tiene lugar durante la etapa de enfriamiento, particularmente entre los 5 y 20 °C, y se lo conoce como “estrés por frío” o “cold shock”. En condiciones fisiológicas, la membrana plasmática del espermatozoide responde al modelo del mosaico fluido, pero a medida que desciende la temperatura, sus fosfolípidos cambian de fase líquido/cristalino a gel, tomando una disposición más compacta. Esto ocasiona una alteración de la arquitectura de la membrana, formándose microdominios lipídicos con una estructura de “no bicapa” y ambientes modificados de proteínas (Watson 2000; Loomis 2011). Como consecuencia de ello, la permeabilidad de la membrana al agua y a los solutos se ve alterada, generándose un flujo de calcio hacia el interior de la célula. Esto desencadena una cascada de señalización característica de la capacitación normal (Bailey y col. 2000) que conduce a la reacción acrosomal y una rápida

muerte celular (Cormier y col. 1997; Gillan y Maxwell 1999; Loomis 2011). La composición lipídica de la membrana varía entre especies, y esto determina que respondan de diferente manera al estrés por frío (Holt 2000), siendo más sensibles aquellas cuyas membranas tengan bajo contenido de colesterol y mayor relación de ácidos grasos poliinsaturados/saturados (ejemplos: toro, carnero vs. conejo y hombre) (Bailey y col. 2000).

Los trabajos de Chang (1951; 1957), en los que se demostró que el PS puede revertir el estado de capacitación espermática, sirvieron de base a una serie de investigaciones orientadas a estudiar el rol del PS sobre la estabilización de las membranas espermáticas, así como en la identificación y aislamiento de dichos factores. Se han elegido como modelos biológicos a los espermatozoides de cerdos y ovinos, por ser más sensibles al estrés por frío. En los párrafos siguientes haremos hincapié en los trabajos realizados en espermatozoides de carneros, destacando similitudes y diferencias con otras especies domésticas.

Rol de las proteínas del plasma seminal

Numerosos trabajos han demostrado que el PS reduce la pérdida de viabilidad y movilidad espermática que ocurren durante las etapas de dilución (Pursel y col. 1973) y refrigeración en la criopreservación (Catt y col. 1997; Barrios y col. 2000). Esto se debería a que en ambos pasos del proceso se produce una desestabilización de las membranas (Maxwell y Johnson 1999). Uno de los componentes mayoritarios del PS son las proteínas y han sido indicadas como responsables de revertir (Ashworth y col. 1994; Maxwell y Johnson 1999; Barrios y col. 2000) o prevenir (Pérez-Pe y col. 2001) los daños ocasionados durante la criopreservación. La capacidad del PS para revertir los daños ocasionados por el frío, acompaña la

estacionalidad reproductiva propia del ovino, el cual se ve reflejado en su perfil proteico (Pérez-Pe y col. 2001; Domínguez y col. 2008). En estos trabajos se observó que un grupo de proteínas del PS se incrementaba en la estación reproductiva (otoño).

Se han identificado varias proteínas de bajo peso molecular (5-22 KDa) con capacidad de revertir los daños ocasionados por el estrés por frío (Barrios y col. 2005; Domínguez y col. 2008). En carneros han sido estudiadas las RSVP14 y RSVP20, de 14 y 20 KDa respectivamente, clasificadas dentro de las fibronectinas con dominio tipo II (Fn-2) (Caballero y col. 2012) y sintetizadas exclusivamente en las vesículas seminales (Fernandez-Juan y col. 2006). Las Fn-2 fueron descritas por primera vez en bovinos, por lo que comúnmente se las conocía como proteínas BSP (bovine seminal plasma) (Caballero y col. 2012). Proteínas homólogas han sido identificadas en el plasma seminal de porcinos (Sanz y col. 1993; Calvete y col. 1997), equinos (Menard y col. 2003), bovinos (Manjunath y col. 2002), caprinos (Villemure y col. 2003), y ovinos (Bergeron y col. 2005; Jobin y col. 2005; Bernardini y col. 2009). Actualmente las siglas BSP han sido redefinidas como “binder seminal plasma” para incluir en esta familia de proteínas a las de todos los mamíferos (Leahy y Graaf 2012). Nuestros trabajos (Bernardini y col. 2011) determinaron en ovinos que además de RSVP20, hay otro grupo de proteínas (lactoferrina, proteína secretoria del epidídimo E1 y SNAP-29) con capacidad de revertir los daños de membrana en espermatozoides criopreservados. Contrariamente, en bovinos, se determinó que las BSP favorecen la capacitación. Esto sería posible debido a su afinidad por la heparina y lipoproteínas de alta densidad (reconocidos factores capacitantes), y su efecto estimulante sobre el eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática (Manjunath y Thérien 2002).

En conejos, la adición de PS posdescongelación, mejoró la motilidad y la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides criopreservados (Bernardini y col. 2009b). Al igual que en el ovino, los perfiles proteicos del PS mostraron variación estacional, tanto en la proporción relativa de proteínas analizadas según su peso molecular como en la abundancia de proteínas individuales (Bernardini y col. 2010).

Por otro lado, el plasma seminal del macho caprino contiene fosfolipasas (EYCE y SBUII) sintetizadas en las glándulas bulbouretrales. Estas enzimas hidrolizan la lecitina de la yema de huevo (presente en los diluyentes seminales) en ácidos grasos y lisolecitina, que alteran la membrana plasmática de los espermatozoides induciendo la reacción acrosómica y la decondensación de la cromatina (Purdy 2006). Por lo tanto, para criopreservar semen caprino se debe proceder a la eliminación del PS mediante lavados o emplear diluyentes a base de lecitina de soja.

Rol de los lípidos del plasma seminal

Los lípidos como colesterol, esteroides análogos y ciertos fosfolípidos, podrían ser considerados componentes crioprotectores naturales del plasma seminal. Sin embargo, es limitada la información disponible sobre la función potencialmente protectora del componente lipídico del plasma seminal. Bernardini (2008) halló que en ovinos, los fosfolípidos mayoritarios (fosfaditilcolina, fosfaditilserina, fosfatidiletanolamina), fosfatidilinositol y colesterol del PS disminuían después de la estación reproductiva (otoño). En bovinos, el colesterol presente en PS está asociado a la calidad espermática, con una significativa variación estacional (Beer-Ljubić y col. 2009).

Si bien no es el tema de este apartado, podemos mencionar que se han realizado trabajos usando lípidos exógenos (principalmente colesterol) para modificar la fluidez de la membrana y disminuir los daños ocasionados por el estrés por frío a través del uso de β -ciclodextrinas (He y col. 2001; Purdy y Graham 2004; Moore y col. 2005; Moce y col. 2010). Recientemente se ha demostrado que el agregado de colesterol o colestanol a las membranas de espermatozoides mejora la supervivencia espermática posdescongelación en toro (Moraes y col. 2010), carneros (Mocé y col. 2010) y padrillos (Moore y col. 2005). Sin embargo, todavía no se han realizado estudios de fertilidad *in vivo*.

Plasma Seminal y fertilidad de espermatozoides criopreservados

Los estudios sobre fertilidad *in vivo* realizados con espermatozoides criopreservados tratados con PS son escasos y contradictorios. Maxwell y Evans (1999) y McPhie y col. (2000), reportaron que en ovinos la adición de PS a espermatozoides congelados/descongelados y depositados en el cuello uterino, incrementó las tasas de gestación. Estos resultados se contraponen con los de O' Meara y col. (2007), quienes no hallaron diferencias en la tasa de preñez. En aquellos trabajos donde se reportó un efecto positivo sobre la fertilidad, se eliminó el diluyente antes de agregar el PS. Esto nos hace pensar que podría producirse algún tipo de competencia por los sitios de unión en la superficie espermática.

En conejos, el incremento de la viabilidad y movilidad espermática observado *in vitro*, no se vio reflejado en la funcionalidad espermática. Los estudios sobre fertilidad y prolificidad *in vivo* con espermatozoides incubados posdescongelación con 10% de PS homólogo (de la misma especie),

evidenciaron un efecto negativo del PS sobre los dos parámetros (Gómez Vítolo 2012). Algo similar ha sido reportado en cerdos, donde la suplementación con 10% de PS revirtió la capacitación en espermatozoides criopreservados, pero no incrementó el número de gametas masculinas en los reservorios útero-tubáricos ni la tasa de pariciones (Kirkwood y col. 2008).

Debemos tener presente que en los eyaculados coexisten subpoblaciones espermáticas que poseen diferentes estados de maduración, capacitación y edad (Abaigar y col. 1999; Muiño Otero 2008) y que esta heterogeneidad se reduce durante la criopreservación (Ollero y col. 1997). Pensamos que los factores capacitantes y decapitantes del PS pueden jugar un papel decisivo en la fertilidad del semen, a través de la regulación de las subpoblaciones espermáticas. Evidentemente, al perderse la heterogeneidad espermática durante la criopreservación, modificamos la capacidad de regulación del PS. Esto nos obliga a trabajar en la identificación de la acción de cada componente para posteriormente poder manipular la sobrevida y funcionalidad espermática.

Reconocimiento: *Una gran parte de la investigación de nuestro laboratorio ha sido financiada por los proyectos PIP-CONICET 114-201001-00273, 112-200801-00232 y EXA 566/12.*

Referencias

Abaigar, T.; Holt, W.V.; Harrison, R.A.P.; del Barrio, G. (1999). "Sperm Subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) Semen as Revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments". *Biology of Reproduction*. 60: 32–41.

Ashworth, P.J.; Harrison, R.A.; Miller, N.G.; Plummer, J.M.; Watson, P.F. (1994). "Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma". *Reprod Fertil Dev*. 6(2), 173-80.

Aumüller, G.; Wilhelm, B.; Seitz, J. (1999). "Apocrine secretion--fact or artifact?". *Ann Anat*. 181(5), 437-46.

Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F.; Cormier, N. (2000). "Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon". *Journal of Andrology*. 21 (1), 1-7.

Barrios, B.; Fernández-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005). "Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock". *J. Androl*. 26(4), 539-49.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tatoo, A.; Osada, J.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2000). "Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane". *Biol Reprod*. 63:1531-1537.

Beer-Ljubić, B.; Aladrović, J.; Marenjak, T.S.; Laskaj, R.; Majić-Balić, I.; Milinković-Tur, S. (2009). "Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation". *Theriogenology*. 72(8), 1132-40.

Bergeron, A.; Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2005). "Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma". *Mol. Reprod. Dev*. 71, 461–470.

Bernardini A.; Hozbor F.; Sanchez E.; Fornés M.W.; Alberio R. H.; Cesari A. (2011). "Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage". *Theriogenology*. 76(3), 436-47.

Bernardini, A. L.; Hozbor, F.; Alberio, R.; Fornés, M. y Cesari, A. (2008). "Efecto de proteínas del plasma seminal sobre la motilidad y ultraestructura de espermatozoides de carnero postdescongelación". *Actas de LIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)*, 19 al 22 de noviembre (pp 191). *Medicina Vol 68 Supl II*, Mar del Plata, Argentina.

Bernardini, A.; Cesari, A.; Alberio, R.; Hozbor, F. (2010). "Seasonal study of the protein profile of seminal plasma from Californian and New Zealand white breed rabbits". *Acta del 4th Congreso de Cunicultura de las Américas*. Del 22 al 24 de septiembre. Córdoba, Argentina.

Bernardini, A.; Hozbor, F.; Manes, J.; Ríos, G.; Sánchez, E.; Alberio, R. y Cesari, A. (2009). "Efecto de proteínas del plasma seminal en la motilidad y fertilidad de espermatozoides ovinos crioconservados". *Acta de 6tas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica*. 14 al 15 de agosto. Mar del Plata, Argentina.

Bernardini, A.; Manes, J.; Ríos, G.; Alberio, R. y Hozbor, F. (2009b). "Efecto del diluyente y del agregado de plasma seminal sobre espermatozoides de conejo crioconservados". *Acta de 6tas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica*. 14 al 15 de agosto. Mar del Plata, Argentina

Burroughs, C.A.; Graham, J.K.; Lenz, R.W.; Seidel, G.E. Jr. (2013). "Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm". *Theriogenology*. 79(3), 551-7.

Caballero, I.; Parrilla, I.; Almiñana, C.; del Olmo, D.; Roca, J.; Martínez, E.A.; Vázquez, J.M. (2012). "Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies". *Reprod. Domest. Ani*. 47(3), 12-21.

Calvete, J.; Sanz L.; Reinert, M.; Dostalova, Z.; Töpfer-Petersen E. (1995). "Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. Advances in spermatozoa phylogeny and taxonomy". Paris: Mém. Mus. Natn, His nat. 515-524.

Carlini, E.; Palmerini, C.; Cosmi, E.; Arienti, G. (1997). "Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity". Arch. Biochem. Biophys. 343, 6-12.

Catt, S.L.; O'Brien, J.K.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1997). "Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry". Reprod Domest Anim. 32, 251-258.

Chang, M.C. (1957). "A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm". Nature. 179, 258 – 259.

Chang, M.C. (1951). "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited inThe fallopian tubes". Nature. 168, 697-698

Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L. (1997). "Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation". J Androl. 18(4), 461-468.

Domínguez, M.P.; Falcinelli, A.; Hozbor, F.; Sanchez, E.; Cesari, A.; Alberio, R.H. (2008). "Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm". Theriogenology. 69, 564–573.

Fabiani, R.; Johansson, I.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. (1994). "Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings". Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 57, 181-188.

Fabiani, R.; Johansson, L.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. (1995). "Prolongation and improvement of prostatic promotive effect on sperm forward motility". Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 58, 191-198.

Fernández-Juan, M.; Gallego, M.; Barrios, B.; Osada, J.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiñoblanco, T. (2006). "Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract". *Reproduction*. 132, 721-732.

Gillan, L.; Maxwell, W. (1999). "The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract". *J Reprod Fertil*. 54(1), 271-283.

Gomez Vítolo, M.A. (2012). "Calidad seminal de espermatozoides criopreservados de conejo incubados con plasma seminal homólogo". Tesis de licenciatura. FCEyN (UNMdP).

Groos, S.; Wilhelm, B.; Renneberg, H.; Riva, A.; Reichelt, R.; Seitz, J.; Aumüller, G. (1999). "Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland". *Cell Tissue Res*. 295(3), 495-504.

He, L.; Bailey, J.L.; Buhr, M.M. (2001). "Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential". *Biol Reprod*. 64, 69-79.

Holt, W.V. (2000). "Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences". *Theriogenology*. 53, 47-58.

Kirkwood, R.N.; Vadnais, M.L.; Abad, M. (2008). "Practical application of seminal plasma". *Theriogenology*. 70 (8), 1364-7.

Leahy, T.; de Graaf, S. (2012). "Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during Processing". *Reprod Domest Anim*. 47 (4), 207-13.

Li, H.; Huang, S.; Guo, C.; Guan, H.; Xiong, C. (2012) "Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms". *PLoS One*. 7(4), e34566.

Loomis, P.R. (2006) "Advanced methods for handling and preparation of stallion semen". *Vet Clin North Am Equine Pract*. 22(3), 663-76.

Loomis, P.R. (2011). "Response of Spermatozoa to Cooling and Theory of Cell Damage". Actas del XVII Congreso Internacionales SIVE, Palacongressid' Abruzzo, Montesilvano (PE). Italy. Del 4-6 Febbraio.

Manjunath, P.; Thérien, I. (2002). "Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation". J Reprod. Immunol. 53(1-2), 109-19.

Maxwell, W. M.; Evans, G.; Mortimer, S.T.; Gillan, L.; Gellatly, E.S.; McPhie, C.A. (1999). "Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma". Reprod Fertil Dev. 11(2), 123-6.

Maxwell, W.M.; Johnson, L.A. (1999). "Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma". Theriogenology. 52, 1353-1362.

McPhie, C.; Evans G.; Maxwell W.M.C. (2000). "Effect of supplementation of fresh and frozen-thawed semen with seminal plasma on fertility of ewes after cervical and intrauterine insemination". Actas del 14 th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm 2

Menard, M.; Nauc, V.; Lazure, C.; Vaillancourt, D.; Manjunath, P. (2003). "Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid". Mol Reprod Dev. 66(4), 349-57.

Moce, E.; Purdy, P.H.; Graham, J.K. (2010). "Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival". Anim Reprod Sci. 118, 236-247.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. (2005). "Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival". Cryobiology. 51 (3), 241-9.

Moraes, E.A.; Graham, J.K.; Torres, C.A.; Meyers, M.; Spizziri B. (2010). Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod.* 118, 148– 154.

Muiño Otero, R. (2008). “Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas”. Tesis de Doctorado, Universidade de Santiago de Compostela, Facultade de Veterinaria, Departamento de Patoloxía Animal: Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. ISBN: 978-84-9750-988-6.

Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A.(2008). “Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress”. *Reprod Domest Anim.* 43 (4), 18-31.

O’Meara, C.M.; Donovan, A.; Hanrahan, J.P.; Duffy, P.; Fair, S.; Evans, A.C.O.; Lonergan, P. (2007). “Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes”. *Theriogenology.* 67 (7), 1262-1268.

Ollero, M.; Cebrian-Perez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (1997). “Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma”. *Journal of Andrology.* 18 (6), 732-739.

Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56: 425-434.

Purdy, P.H. (2006). “A review on goat sperm cryopreservation”. *Small Ruminant Research.* 63, 215–225.

Purdy, P.H.; Graham, J.K. (2004). “Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm”. *Cryobiology.* 48(1), 36-45.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L. (1973). “Effect of Dilution, Seminal Plasma and Incubation Period on Cold Shock Susceptibility of Boar Spermatozoa”. *J Anim.Sci.* 37, 528-531.

Remes Lenicov, F.; Rodriguez Rodrigues, C.; Sabatté, J.; Cabrini, M.; Jancic, C.; Ostrowski, M.; Merlotti, A.; Gonzalez, H.; Alonso, A.; Pasqualini, R.A.; Davio, C.; Geffner, J.; Ceballos, A. (2012). "Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells". *J Immunol.* 189(10), 4777-86.

Ronquist, G.; Brody, I. (1985). "The prostasome: its secretion and function in man". *Biochim Biophys Acta.* 822(2), 203-18.

Rugh, R. (1990). *The Mouse: its reproduction and development.* Oxford University Press. USA.

Sanz, L.; Calvete, J.J.; Mann, K.; Gabius, H.J.; Topfer-Petersen, E. (1993). "Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for sperm adhesins in fertilization". *Mol. Reprod. Dev.* 35(1), 37-43.

Sherwood, L. (1997). "Human physiology: from cells to systems". Belmont, CA Wadsworth Pub. Co en "Mechanisms of Sperm Motility, Dr. Charles Lindemann" [en línea]. Consultado el 15 de junio de 2013 en <http://www2.oakland.edu/biology/lindemann/spermfacts.htm>.

Stegmayr, B.; Ronquist, G. (1982). "Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomas". *Urol Res.* 10(5), 253-257.

Suarez, S.S. "Gamete and Zygote Transport". In: Neill, J.D. editor. (2006). *Physiology of Reproduction.* San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 113-145.

Troedsson, M.H.; Desvousges, A.; Alghamdi, A.S.; Dahms, B.; Dow, C.A.; Hayna, J.; Valesco, R.; Collahan, P.T.; Macpherson, M.L.; Pozor, M.; Buhi, W.C. (2005). "Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination". *Anim. Reprod. Sci.* 89(1-4), 171-86.

Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2003). "Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma". *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 39.

Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Animal Reproduction Science.* 60–61, 481–492.

Capítulo 6

La Próstata

Enrique Castellón

Como ya hemos mencionado la próstata una de las principales glándulas anexas o accesorias del tracto reproductor masculino.

6.1 Anatomía y morfología de la próstata

La glándula prostática está compuesta por tejido epitelial y estromal que están en íntima relación estructural y funcional. Tiene la forma de una castaña, su tamaño en el humano es de aproximadamente 20 a 30 cc, y su peso alrededor de 25 gr. Se sitúa por debajo de la vejiga y rodea una parte importante de la uretra. Está envuelta por una cápsula fibrosa que es una característica exclusiva de la especie humana. En la próstata del hombre se distinguen cuatro zonas histológicamente distintas (Fig. 1): Zona de transición: representa menos del 10% del volumen glandular y se encuentra rodeando la uretra. Es importante ya que es en esta zona donde se desarrolla la hiperplasia benigna de la próstata. Zona central: corresponde a cerca del 20% de la glándula y se sitúa cercana a las vesículas seminales. Posee acinos grandes de contornos irregulares y un estroma laxo. Zona anterior: corresponde principalmente a estroma fibromuscular y representa cerca de un 15% del la glándula. Zona periférica: representa el mayor porcentaje de la próstata y se sitúa en la cara posterior de la glándula. Posee acinos pequeños y redondos y un estroma compacto. Es importante ya que en ella se desarrolla el 90% de los carcinomas prostáticos.

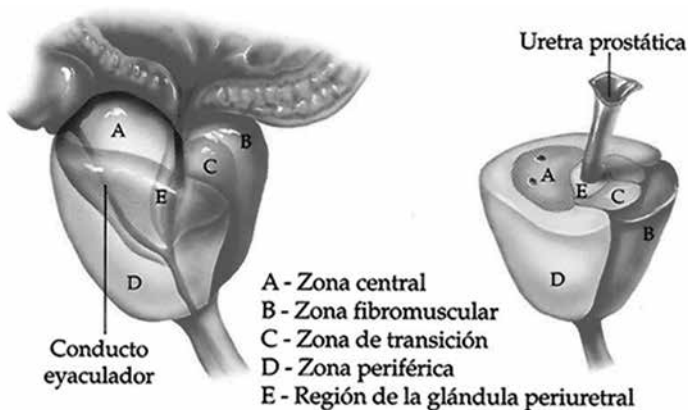


Figura 1. Esquema de las zonas de la próstata. (Imagen tomada de Internet: http://www.elurologo.es/imagenes/imagenes_texto_2/grandes/zonas_de_la_prostata.jpg).

6.2 Desarrollo embrionario

La próstata se origina desde el seno urogenital a partir del tercer mes del desarrollo fetal en el humano y su desarrollo es absolutamente dependiente de la dihidrotestosterona (DHT). Esta hormona es producida a partir de la conversión de la testosterona fetal por la enzima 5-alfa-reductasa presente en el seno urogenital. Diferentes brotes epiteliales formados desde el seno urogenital invaden el tejido mesenquimático adyacente para formar las distintas zonas de la glándula prostática. A partir de estos brotes se forman los acinos y los conductos prostáticos que luego se arborizan y desembocan en la uretra. Este proceso está controlado por importantes genes homeóticos como “sonic hedgehog” (Shh) y “forkhead box A1” (FoxA1). Durante el desarrollo embrionario de la próstata se establece una estrecha relación paracrina entre

el epitelio y el estroma que es determinante en la maduración final de la glándula. El epitelio produce la mayor conversión de testosterona en DHT, sin embargo, son las células estromales las que poseen receptores para andrógenos en esta etapa del desarrollo. De este modo, son estas últimas las que, estimuladas por DHT, producen una serie de factores de crecimiento que paracrinamente inducen el desarrollo de la organización epitelial. A estos factores de crecimiento estimulados por la DHT suele llamárseles andromedinas.

6.3 Organización celular de la próstata

Desde el punto de vista histológico, la glándula prostática adulta está formada por un epitelio secretor irregular que presenta muchos pliegues y lúmenes muy amplios (Fig. 2). Puede presentarse simple o pseudoestratificado y varía desde una forma cilíndrica a cúbica, exhibiendo una lámina basal poco definida. Es frecuente que las secreciones prostáticas se condensan y calcifiquen en el lumen de los acinos formando estructuras laminares denominadas cuerpos amiláceos. El estroma es fundamentalmente fibromuscular e incluye fibroblastos, células inmunes, células nerviosas y bandas de fibras musculares lisas, cuya contracción es fundamental en la expulsión del contenido prostático en el momento de la eyaculación. El epitelio está constituido por diferentes tipos celulares:

- Células basales: se presume que son las precursoras de las células secretoras. Forman una capa asociada a la lámina basal y presentan marcadores típicos de células progenitoras, no poseen receptores para andrógeno ni tampoco sintetizan los productos de secreción prostática.

- Células luminales: son las células secretoras propiamente. Son el componente mayoritario del epitelio y representan las células más diferenciadas, poseen receptores para andrógeno y sintetizan los productos de secreción prostática.
- Células neuroendocrinas: su presencia es escasa y se ubican entre las células secretoras hacia la base del epitelio. Su función no es del todo conocida, expresan marcadores como cromogranina A y sinaptofisina y no poseen receptores para andrógeno.
- Células troncales: son células pluripotentes capaces de originar todos los tipos celulares anteriores y se encuentran en número reducido en el epitelio prostático. No poseen receptores para andrógeno y expresan los principales marcadores de troncalidad.

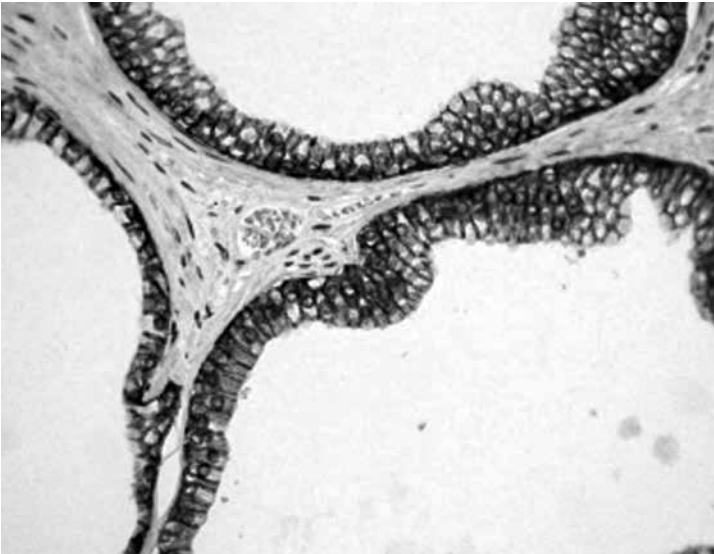


Figura 2. Microfotografía de una glándula prostática normal. Se muestran destacadas (tonalidad oscura) mediante inmunohistoquímica las moléculas de adhesión (E-cadherina). (Foto: J. Vergara, MSci. y H.R. Contreras, PhD. LACyM).

6.4 Fisiología prostática

Secreción prostática: La próstata secreta 500 a 750 uL de un fluido lechoso que representa entre un 20 a 25% del volumen seminal. Entre los productos más importantes están el ácido cítrico, la fructosa, la espermina, algunas prostaglandinas, algunos cationes como calcio y zinc, y varias enzimas como fosfatasa alcalina, calicreínas y proteasas, donde destaca la serinaproteasa conocida como el antígeno prostático específico (PSA). No se conoce con exactitud el papel de cada una de estas sustancias en la función gamética, sin embargo, se sabe que el zinc es un potente agente bacteriostático y estabiliza la cromatina del espermatozoide. Las proteasas, particularmente el PSA, son fundamentales para licuefacción del plasma seminal.

Endocrinología prostática: El crecimiento y la función prostática están regulados principalmente por los andrógenos. La DHT es el principal andrógeno que regula la próstata. Ésta es producida a partir de la testosterona testicular mediante la acción de la enzima 5-alfa-reductasa que está presente en el epitelio prostático. No obstante que la próstata tiene las enzimas que pueden convertir los andrógenos suprarrenales en testosterona, éstos solo tienen un efecto marginal y la castración, ya sea quirúrgica o farmacológica, produce una rápida atrofia de la glándula. Tanto las células epiteliales como estromales poseen receptores para andrógeno, en la próstata adulta, por lo que ambos tipos celulares responden al estímulo androgénico. El mecanismo principal de la regulación androgénica es a través de sus receptores citosólicos, que al activarse son transportados al núcleo donde se unen a elementos de respuesta específicos en el DNA, regulando la expresión de los genes blanco. Los estrógenos también tienen un papel regulador de la función prostática. Tanto las células epiteliales como estromales poseen activi-

dad aromatasa, que transforma testosterona en estradiol. Además, ambos tipos celulares poseen receptores para estradiol. Esta hormona mantiene el estado diferenciado de las células epiteliales y modula la actividad de las células estromales.

Regulación paracrina y autocrina de la próstata: Un aspecto relevante en la regulación de función prostática es la acción reguladora entre los distintos tipos celulares. El estroma produce una serie de factores de crecimiento, tales como EGF, FGF, NGF, neurotransmisores y citoquinas, entre otros, que mantienen la función epitelial. Por otra parte, las células epiteliales, en respuesta a la DHT y a los factores paracrinos del estroma, secretan sus productos al lumen glandular y producen a su vez, factores que regulan el estroma y, autocrinamente, su propia actividad. Esto hace que la función prostática esté controlada en forma principal por la DHT, pero modulada en forma local por una fina red de interacciones celulares en las que también participan las uniones intercelulares y la matriz extracelular con sus respectivas moléculas asociadas.

6.5 Patología prostática

La glándula prostática es objeto de varias patologías que afectan al hombre, en mayor o menor grado, en diferentes etapas de su vida. Entre las principales patologías que la afectan se cuentan la prostatitis (aguda y crónica), la hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata.

Prostatitis: es una inflamación a la próstata cuyo agente causal es una bacteria o un virus. Los agentes causales más frecuentes son los bacilos gram negativos. En su fase aguda pueden ser purulentas e incluso tener abscesos y afec-

tan con mayor frecuencia a hombres menores de 40 años. Su presentación clínica es típica de un cuadro inflamatorio, con síntomas urinarios, y se puede diagnosticar a través de un tacto rectal, donde por medio de un masaje prostático se obtiene material para realizar un análisis citológico. Su tratamiento es usualmente en base a antibióticos. Es frecuente que luego del tratamiento la enfermedad se haga asintomática y luego recurra. La prostatitis crónica es más frecuente que la anterior y afecta en mayor medida a hombres mayores de 50 años. En el exudado prostático suelen aparecer leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Su tratamiento es más complejo y largo. Existen prostatitis crónicas que no son de origen bacteriano y la causa de la inflamación crónica no está del todo precisada. En estos casos suele tratarse con relajadores de la musculatura lisa prostática (fármacos alfa-bloqueadores).

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB): La HPB es una patología que afecta a la gran mayoría de los hombres mayores de 50-60 años y es uno, aunque no el único, de los factores que produce una serie de molestos síntomas urinarios, tales como aumento de la frecuencia de la micción, particularmente en la noche, dolor e irritación, alteraciones en el vaciamiento de la vejiga, etc. La HPB se caracteriza por un aumento en el número de células epiteliales y estromales en la zona de transición de la próstata (Fig. 3). Como se describió anteriormente, esta zona rodea la uretra y esta es una de las razones por la cual su aumento causa los síntomas urinarios. La etiología molecular de la HPB no está totalmente aclarada. Tampoco está claro que el aumento del número de células sea exclusivamente por un incremento exagerado de la proliferación celular. La evidencia reciente indica que es altamente probable que esté desbalanceado el equilibrio entre la proliferación y la apoptosis (muerte celular programada)

y es evidente que los andrógenos y los factores paracrinos y autocrinos de la próstata desempeñan un papel fundamental en la etiopatogenia de esta enfermedad. Su fase inicial se caracteriza por la aparición de pequeños nódulos que, en la región periuretral, están constituidos fundamentalmente por estroma y en la zona de transición propiamente tal están constituidos inicialmente por estroma y luego por tejido epitelial. Es importante destacar que la HPB es un proceso donde, en general, el aumento del estroma domina sobre el posterior crecimiento glandular. A medida que va progresando la HPB los nódulos en crecimiento van reemplazando el tejido normal. Este proceso es entonces progresivo que se inicia con la aparición de nódulos pequeños, principalmente de origen estromal, que luego inician una fase de crecimiento rápido donde se recluta también tejido glandular, aumentando de esta manera el tamaño de la glándula y produciéndose los síntomas ya descritos. Algunos estudios han establecido que la próstata crece de 20 a 40 gr en promedio y el tejido estromal aumenta de un 25 a un 60% en pacientes con HPB. En cuanto al tejido glandular, éste también se encuentra aumentado de tamaño y en la hiperplasia de células basales éstas pueden aumentar ocupando parte del lumen del acino. La HPB puede ser clasificada en los siguientes tipos diferentes de acuerdo a la proporción de los tejidos que constituyen sus nódulos: adenoma, fibromioma, adenofibromioma y adenomioma, siendo el más prevalente el adenofibromioma. Los principales métodos de diagnóstico para la HPB lo constituyen una buena anamnesis y examen físico, el tacto rectal, la determinación de los niveles plasmáticos de PSA y la flujometría urinaria, entre otros. En cuanto a los tratamientos, éstos pueden variar de acuerdo al estado de la patología y los síntomas del paciente. En estados iniciales y en pacientes con pocos síntomas, suele recurrirse a la llamada “espera vigilante” que consiste en monitorear periódicamente al

paciente y minimizar los factores de riesgo. En etapas más avanzadas y en pacientes con síntomas urinarios, se utilizan los inhibidores de la enzima 5-alfa-reductasa para impedir la producción prostática de DHT que, como se ha mencionado anteriormente, estimula el crecimiento prostático. También se utilizan los bloqueadores de los receptores alfa-adrenérgicos para relajar la musculatura lisa de la próstata y del cuello de la vejiga. Hoy en día es frecuente utilizar el tratamiento combinado de estas drogas. Cuando la enfermedad ha progresado produciendo obstrucción de la vía urinaria, o en los pacientes que no mejoran con los tratamientos farmacológicos, está la opción quirúrgica, en la que se reseca total o parcialmente la glándula prostática. En la actualidad también existen otros métodos llamados “mínimamente invasivos” en los que se destruye el tejido hiperplásico localmente con ultrasonido, microondas u otros agentes.

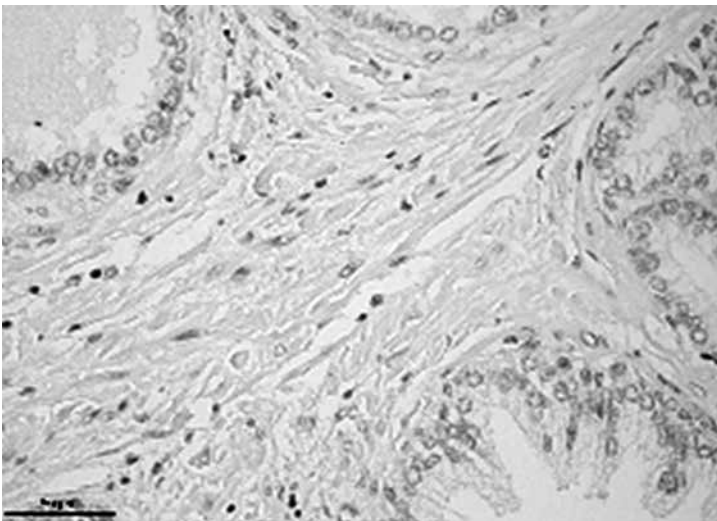


Figura 3: Microfotografía de una glándula prostática con hiperplasia benigna. (Foto: J.L. Tirapegui, MD. y H.R. Contreras, PhD. LACyM).

Cáncer prostático: El cáncer prostático es una patología oncológica de alta prevalencia en el mundo, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en varones. A pesar que es más frecuente en hombres de edad avanzada (sobre los 50 años), recientemente se ha incrementado el número de casos en hombres menores. Como se mencionó anteriormente, más del 90% de los cánceres prostáticos se originan en la zona periférica (posterior) de la glándula, es por eso que, en su etapa inicial, esta patología es asintomática y su diagnóstico, por lo tanto, generalmente tardío, limitando seriamente las posibilidades de una terapia curativa oportuna. Los factores de riesgo más importantes son la edad, los antecedentes familiares (factores genéticos), la etnia, la dieta y en general los hábitos de vida (sedentarismo, tabaquismo, drogas, etc.). El carcinoma prostático se caracteriza por una transformación de las células epiteliales, con pérdida de su polaridad morfológica y funcional. También ocurre pérdida de la arquitectura epitelial debido a la desorganización de las uniones intercelulares como consecuencia de alteraciones en las moléculas de adhesión. Esto hace que el PSA, entre otros productos de secreción, difunda hacia el estroma y, por lo tanto, a la circulación sanguínea, aumentando sus niveles plasmáticos. También existe un aumento muy importante en la capacidad proliferativa de las células epiteliales luminales y una disminución significativa de las células basales. Esta desorganización del tejido epitelial se puede graduar operacionalmente mediante la escala de Gleason, que clasifica la desorganización epitelial en 5 grados, siendo el 1 el más diferenciado (más similar al epitelio normal) y el 5 el más indiferenciado (más desorganizado) (Fig. 4). Dado que el cáncer de próstata se presenta en forma multifocal, los distintos focos neoplásicos pueden presentar diferentes grados de desorganización epitelial, lo que complica el diagnóstico patológico. Para resolver esto, se estableció el índice de Gleason que

consiste en sumar los grados histológicos de los focos más prevalentes en una biopsia diagnóstica. Es decir, para la clasificación de un paciente de acuerdo al índice de Gleason la escala va de 2 a 10.

Como en todo proceso carcinogénico, el cáncer prostático comienza con la transformación de un conjunto de células que acumulan cambios en su genoma. Estos cambios afectan a genes críticos que influyen en el control de la proliferación, conocidos como oncogenes y genes supresores de tumores. Entre los genes más frecuentemente afectados en esta etapa inicial de la transformación maligna se cuentan Ras, c-myc, c-fos, Her2, PI3K (oncogenes) y PTEN, p53, APC (supresores de tumores), entre otros. La manifestación morfológica de estas alteraciones se evidencia al comienzo con la desorganización epitelial antes mencionada, el aumento de la proliferación celular, la pérdida de contactos intercelulares y cambios en el fenotipo celular. Estos cambios o “atipias” celulares, van transformando a una célula diferenciada y polarizada morfológica y funcionalmente en una que se asemeja mucho a una célula mesenquimal. Es por esta razón que a este proceso de transformación maligna se le conoce también como “transición epitelio-mesenquimal”. Cuando la

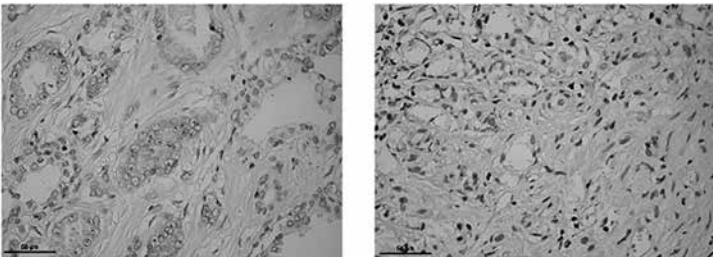


Figura 4. Microfotografías de una glándula prostática con cáncer. Izquierda: Lesión de bajo grado histológico. Derecha: Lesión de alto grado histológico. (Fotos: J.L. Tirapegui, MD. y H.R. Contreras, PhD. LACyM).

lesión está circunscrita al epitelio se le denomina neoplasia intra-epitelial prostática o PIN (por su sigla en inglés) (Fig. 5). En una etapa posterior, las células adquieren, debido a nuevas alteraciones genéticas, propiedades invasivas y migratorias, las que las habilitan para degradar la lámina basal que separa el epitelio del estroma e invadir este último tejido (Fig. 6). En este momento se habla de un carcinoma invasivo órgano confinado, ya que el tumor está circunscrito aún a la glándula prostática.

Si el cáncer protático es detectado en esta etapa, el pronóstico es bueno ya que el tratamiento más frecuente es la resección quirúrgica de la próstata, con intención curativa. Sin embargo, con células malignas en el estroma, con eventual acceso a capilares sanguíneos y linfáticos, el riesgo de que algunas de ellas, con capacidad iniciadora de tumor, alcancen tejidos distantes es alto y, por esta razón, un por-

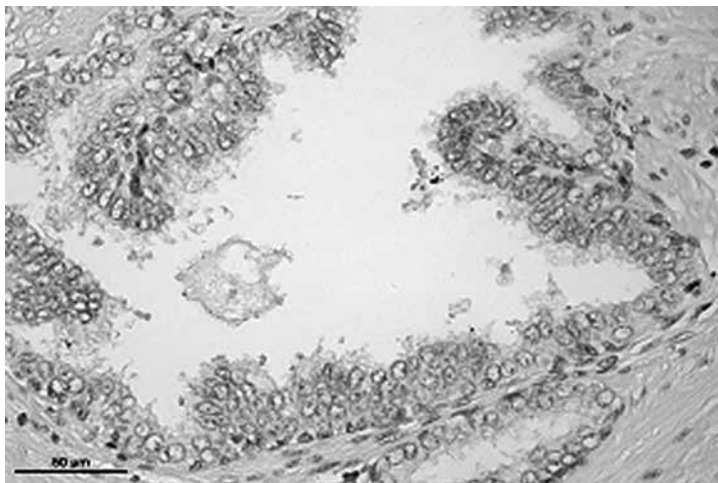


Figura 5. Microfotografía de una glándula prostática con una lesión neoplásica intra-epitelial (PIN). (Foto: J.L. Tirapegui, MD. y H.R. Contreras, PhD. LACyM).

centaje de pacientes sometidos a tratamientos quirúrgicos con intención curativa, recaen al cabo de cierto tiempo. La probabilidad de acceso de células malignas al torrente sanguíneo se eleva rápidamente debido a que éstas comienzan a producir factores pro-angiogénicos, como el VEGF, que favorecen la neo-angiogénesis y la consecuente irrigación del tumor. Si el cáncer prostático no es detectado en esta etapa localizada y se disemina por los nódulos linfáticos y, por vía sanguínea, a otros tejidos, usualmente los huesos, el tratamiento ya es sólo paliativo. En un comienzo, la opción es la hormono-terapia que consiste en bloquear la producción de andrógenos testiculares a través de un fármaco (análogo del neuropéptido GnRH) que inhibe la producción de gonadotrofinas. Esto produce una atrofia testicular y una caída en los niveles plasmáticos de testosterona. Como se explicó anteriormente, esta hormona es indispensable para la síntesis prostática de DHT que, tal como regula el crecimiento normal de la próstata, estimula también el crecimiento tumoral, por lo que su disminución hace más lento el avance del cáncer. Sin embargo, en un tiempo que suele ser variable entre los distintos pacientes, las células malignas, a través de nuevas alteraciones genéticas que afectan tanto al receptor de andrógeno como a otros ejes autocrinos de factores de crecimiento, se hacen insensibles a los andrógenos, y en ese momento la hormonoterapia deja de ser efectiva. La quimioterapia, herramienta terapéutica importantísima en la mayoría de los cánceres, en el caso del cáncer de próstata es muy poco efectiva ya que esta patología presenta una elevada resistencia intrínseca a las drogas. El cáncer prostático metastizado y hormono-resistente es, entonces, el de peor pronóstico. No obstante todo lo anterior, los cánceres prostáticos no se comportan todos de la misma manera y al momento del diagnóstico es difícil predecir cómo evolucionará cada paciente. Esto dificulta la decisión terapéutica, espe-

cialmente para cánceres localizados. En la actualidad existen algunas herramientas como los nomogramas que, a través del análisis de una variedad de parámetros clínicos, permiten predecir aproximadamente el curso de la patología, pero su eficacia en la predicción del desarrollo tumoral es limitada. Como la naturaleza tumoral es individual para cada paciente, distintos pacientes presentarán un comportamiento tumoral diferente, por lo tanto, es fundamental caracterizar de forma precisa cada tumor y así poder elegir la terapia más adecuada al desarrollo de éstos. Los análisis genómicos y proteómicos han provisto de muchos nuevos marcadores que pueden ayudar a definir parámetros pronósticos relacionados con la progresión del cáncer prostático a nivel molecular. Estos mar-

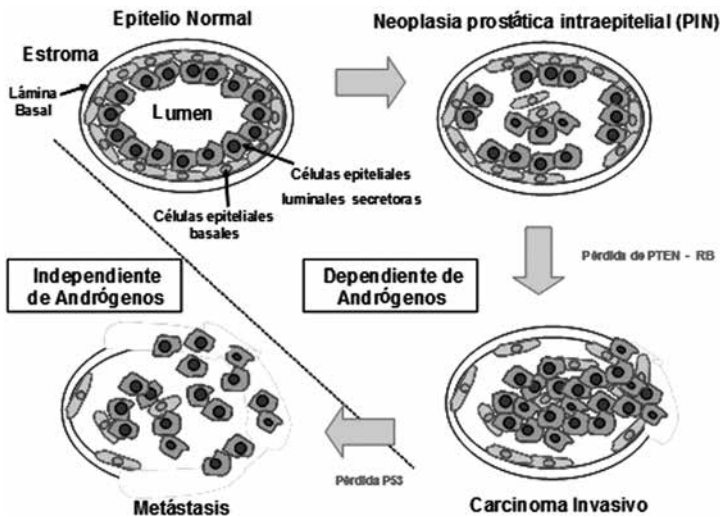


Figura 6. Esquema que muestra la secuencia del proceso de desorganización del epitelio prostático durante el proceso carcinogénico. (Dibujo gentileza Marisa Clementi, MSci. Tesis de Magíster, LACyM).

cadres moleculares, dentro de los que se cuentan aquellos relacionados con proliferación, apoptosis, migración, invasión, angiogénesis, metástasis y resistencia a drogas, representan una herramienta muy útil para aumentar la precisión del diagnóstico, mejorar el pronóstico y optimizar el tratamiento. La tasa de crecimiento tumoral del cáncer prostático varía de muy lenta a moderadamente rápida, y algunos pacientes tienen una supervivencia de cinco o más años incluso después de que el cáncer ha hecho metástasis a sitios distantes, como el hueso. La etiología del cáncer prostático no está completamente comprendida, por lo que el enfoque del tratamiento está determinado por la edad y los problemas médicos coexistentes. Los efectos secundarios de las diversas formas de tratamiento se deben considerar seriamente al seleccionar la terapia apropiada. A pesar de la alta incidencia del cáncer de próstata, todavía existe controversia en cuanto al valor de los exámenes de detección, a la evaluación más apropiada de clasificación y al tratamiento óptimo para cada etapa de la enfermedad. El método diagnóstico actualmente en uso combina el tacto rectal y la determinación de los niveles plasmáticos del PSA, debiendo confirmarse a través de la evaluación anatomopatológica de biopsias prostáticas. Cabe destacar que el PSA, a pesar de ser un marcador relativamente bueno para tamizaje o screening diagnóstico, su valor como elemento predictivo de evolución tumoral y respuesta a terapia es bastante más modesto.

En la actualidad hay consenso en que el cáncer prostático y su progresión, y por lo tanto también su tratamiento, son altamente dependientes de las características de cada paciente. Por lo que la idea de un análisis diagnóstico personalizado ha ido creciendo en la comunidad científica y clínica. Este análisis adecuado a cada enfermo permitiría predecir, dentro de cierto rango, el pronóstico de la evolución del paciente y la elección del mejor tratamiento disponible.

Sin embargo, aún no se ha desarrollado en el mercado diagnóstico, un producto o sistema de análisis personalizado de marcadores adecuadamente validados ni de sistemas que permitan ensayar *in vitro* las diferentes opciones terapéuticas disponibles y/o adecuarlas a cada paciente. Varios grupos de investigación en el mundo trabajan para desarrollar sistemas de análisis tumoral personalizado que permitirían un diagnóstico más preciso a nivel molecular, un pronóstico más acertado y un análisis de la sensibilidad de cada tumor a los distintos tratamientos.

6.6 Avances en nuevos enfoques terapéuticos para el cáncer prostático

Sensibilización de las células de cáncer prostático a la hormonoterapia

En el último tiempo se ha extendido el uso de análogos de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH), con el objeto de inhibir la secreción de gonadotropinas y bajar los niveles plasmáticos de testosterona. En pacientes tratados con estos análogos se ha observado que, adicionalmente al freno del crecimiento tumoral por la privación de andrógenos, existe una disminución de los focos cancerosos pre-existentes. Este hecho, junto a la presencia de receptores para GnRH en la membrana plasmática de las células del tejido epitelial, tanto normal como maligno, ha llevado a proponer alguna acción local para estos péptidos. En nuestro laboratorio (LACyM), hemos demostrado un efecto inhibitorio de la proliferación y estimulador de la apoptosis, de agonistas y antagonistas de GnRH. Este estudio se realizó en un sistema de cultivos primarios bicamerales en los cuales se mantiene, en gran medida, la relación paracrina entre el estroma y las células epiteliales (Fig. 7). También, hemos

encontrado evidencias de que los efectos de los análogos de GnRH estarían mediados por la regulación de la expresión de receptores para neurotrofinas (NGF).

Desafortunadamente, los tratamientos antiandrogénicos no son efectivos cuando el cáncer prostático se hace insensible a los andrógenos y esto ocurre en etapas avanzadas del cáncer cuando los pacientes presentan metástasis. En estos casos, las posibilidades terapéuticas se limitan seriamente debido a que el cáncer prostático es especialmente poco sensible a la quimioterapia. Por otra parte, en estas etapas avanzadas del tumor, la presencia de receptores para GnRH también disminuye haciendo el efecto local de esta droga mucho menos efectivo. Nuestro grupo ha abordado también este problema, encontrando que el receptor para GnRH en células de cáncer protático se encuentra, en una buena medida, retenido en el retículo endoplásmico (RE) debido a su plegamiento proteico. Con la ayuda de una farmacoperona

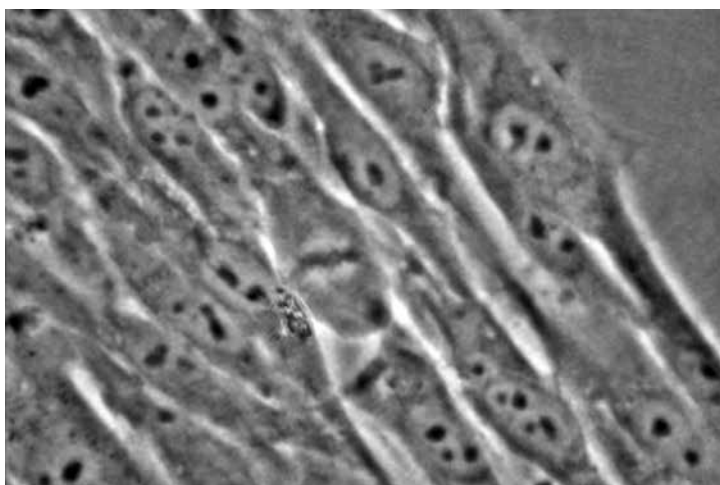


Figura 7. Fotografía de células de cáncer prostático en cultivo vistas al microscopio de contraste de fase. (Foto: E.A. Castellón, PhD. LACyM).

liposoluble hemos logrado recuperar la sensibilidad de estas células al efecto de los análogos de GnRH. La farmacoperona es una molécula que difunde por la membrana celular, llega al RE, se une al receptor para GnRH retenido allí, cambia su plegamiento y le permite seguir su vía hasta la membrana plasmática donde es funcional. Como resultado de este tratamiento, las células cancerosas aumentan la cantidad de receptores para GnRH expuestos en su membrana plasmática haciéndose sensibles al efecto apoptótico de los análogos de GnRH. Estos resultados pueden tener importantes proyecciones clínicas en el tratamiento de pacientes andrógeno-resistentes.

Sensibilización de las células de cáncer prostático a la quimioterapia

La quimioterapia es aún uno de los pilares fundamentales en el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, el cáncer prostático es uno de los pocos que presenta una elevada resistencia intrínseca a las drogas quimioterapéuticas, por lo que esta herramienta es muy poco efectiva. Por esta razón, se ha hecho necesario emprender estudios que conduzcan a una mejor comprensión de los mecanismos que llevan a esta resistencia las drogas, lo que permitiría interferir o bloquear estos mecanismos y recuperar la sensibilidad de las células malignas a las drogas antineoplásicas, poniendo a disposición esta poderosa herramienta terapéutica, especialmente para los casos de cánceres prostáticos avanzados.

El escaso éxito de la quimioterapia en el caso del cáncer protático, puede deberse a mecanismos de multiresistencia a drogas que podrían ser distintos en diferentes pacientes. Recientemente, se han elaborado arreglos (arrays) de genes para varias vías conducentes a la multiresistencia a drogas o MDR (por su sigla en inglés). La evidencia indica que algunos

mecanismos conocidos de MDR podrían estar operando en el cáncer prostático. Esto ha reforzado el interés de los investigadores por estudiar más en detalle la relación entre estos mecanismos y el grado de progresión tumoral, por lo que la posibilidad de bloquear estas vías para mejorar la sensibilidad de las células tumorales prostáticas a nuevas drogas quimioterapéuticas se abre como una herramienta factible para emplear en pacientes avanzados. En general, existe poca información acerca de las proteínas involucradas en la multiresistencia a drogas en cáncer prostático. Nuestro grupo de investigación ha estudiado este problema y hemos encontrado que existe una correlación positiva entre el grado de maligni-

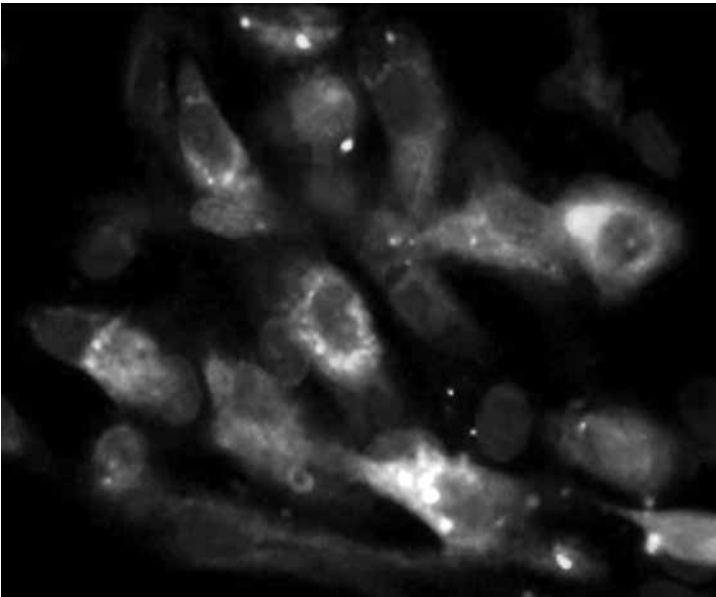


Figura 8. Fotografía de células de cáncer prostático en cultivo que sobre-expresan proteínas de multiresistencia a drogas (transportador ABC) detectadas por inmunofluorescencia (tonalidad brillante). (Foto: V. Castillo, MSci y E.A. Castellón, PhD. LACyM).

dad de los tumores y la sobre-expresión de varias proteínas de MRD, entre ellas Gp-P y la MRP1, que pertenecen a una familia de transportadores de membrana denominados ABC, que trabajan como bombas efusoras transportando sustratos específicos y drogas hacia el exterior de la células. Además, hemos encontrado que está sobre-expresada la proteína LRP, que es un complejo transportador asociado a la membrana nuclear, que dificulta que muchas drogas antineoplásicas que actúan sobre el DNA de la célula cancerosa puedan ser retenidas en el núcleo (Fig. 8). Para abordar este problema, utilizando nuestro modelo de cultivo de células cancerosas, hemos logrado inhibir farmacológicamente estas proteínas logrando una sensibilización parcial de las células a diferentes drogas. Por otro lado, utilizando técnicas moleculares con pequeños RNAs de interferencia (siRNA), que bloquen la traducción de RNAs mensajeros específicos, en este caso de las proteínas MDR de interés, hemos podido inhibir parcialmente su síntesis recuperando, en parte, la sensibilidad de las células de cáncer prostático a la quimioterapia. El uso futuro de estos tratamientos combinados podría ser de gran utilidad terapéutica para pacientes con cánceres resistentes.

Células troncales tumorales como potencial blanco terapéutico

Uno de los grandes problemas que enfrentamos, tanto los investigadores básicos con nuestros distintos modelos de estudio como los médicos oncólogos en la terapia de sus pacientes, es que tratamientos inicialmente efectivos, se vuelven luego inefectivos, debido a que las células tumorales remanentes pueden volver a crecer y generar más focos tumorales en forma recurrente. Hoy se sabe que un tumor maligno no es una masa celular homogénea, sino que está compuesto por poblaciones celulares diferentes. Muchas de estas

células son sensibles a los diferentes tratamientos y drogas hasta hoy desarrollados. Sin embargo, se ha identificado en la mayoría de los cánceres, una pequeña población celular, resistente a todas las terapias, que tiene una característica muy particular: una sola de estas células es capaz de generar un tumor completo, con toda su heterogeneidad celular. Por las características celulares, moleculares y funcionales de estas células, se les ha denominado células troncales tumorales o CSCs (por su nombre en inglés, “cancer stem cells”). Esto porque en los aspectos mencionados se asemejan bastante a las células troncales normales, que son capaces de originar toda la variedad celular de un órgano o tejido. Sin embargo, algunos investigadores han discutido este nombre, debido a que existe alguna controversia acerca de su origen. Algunos postulan que provendrían de la transformación maligna de una célula troncal normal y otros piensan que, a través del proceso de transición epitelio-mesenquimal, una población seleccionada de células tumorales expresaría genes de pluripotencialidad constituyendo esta población de CSCs. Es por esto que muchos investigadores prefieren identificarlas por su principal característica: capacidad de iniciar tumores, y por ello también se conocen con el nombre de “células iniciadoras de tumores” o “TICs” (por su nombre en inglés, “tumor-initiating cells”). Independiente de su nombre, hay mucha evidencia de que esta población celular tumoral es la responsable de la metástasis, la recurrencia y la resistencia a los distintos tratamientos. Por esta razón, estas células se han convertido en el blanco de muchas investigaciones en los últimos años. La idea principal de la mayoría de los estudios en este campo es identificar estas células, luego aislarlas y caracterizarlas desde el punto de vista genético, molecular y funcional, con el objeto de buscar potenciales blancos para eliminarlas o transformarlas en células sensibles. Nuestro grupo ha emprendido esta tarea en el cáncer prostáti-

co y hemos identificado, a través de marcadores específicos (proteínas de superficie) estas CSCs o TICs en muestras de pacientes con cánceres de distinto grado. Además, hemos logrado aislar y caracterizar parcialmente estas células, con el propósito de seleccionar algunos genes que le confieren esta característica de troncalidad. En la actualidad estamos trabajando para manipular genéticamente estas células con el fin de lograr que se hagan sensibles a los tratamientos antineoplásicos.

Hacia una terapia personalizada contra el cáncer

Los nuevos enfoques básico-clínicos en la investigación científica y médica en el área del cáncer han dado lugar al cultivo de lo que se ha bautizado como “medicina traslacional”. El término es un anglicismo adaptado de translational medicine, que significa una traducción de la información generada en los laboratorios de ciencia para su aplicación a la práctica médica, es decir, una medicina basada en la evidencia científica. Esto ha obligado a generar grupos multidisciplinarios de investigadores para resolver problemas de la medicina a través de la ciencia básica. Esta relación está dando sus frutos y en la actualidad está bastante claro que cada paciente presenta tumores con características moleculares distintas, que deben ser estudiados individualmente para poder hacer un pronóstico más acertado de la progresión de la enfermedad y la respuesta de cada uno de ellos a los distintos tratamientos. Además, no solo es indispensable conocer las características individuales del tumor, sino, además, la genética de cada paciente. Por ejemplo, se sabe que cada uno de nosotros metaboliza las drogas de manera diferente, ya que los genes que codifican esas enzimas metabolizantes presentan variaciones individuales (polimorfismos) que hacen que las dosis efectivas de las drogas puedan ser muy distintas para cada indi-

viduo, aun cuando presenten el mismo tipo de cáncer. Esto genera la necesidad de una mirada individual a cada paciente y una terapia personalizada para los distintos tipos de cáncer. A esto es lo que debiera apuntar la medicina moderna en el futuro próximo.

Reconocimiento: Parte importante de la investigación de nuestro laboratorio aquí resumida ha sido financiada por los proyectos FONDECYT 1100183, 1070827 y 1020969.

Referencias

Castellón, E., Clementi, M., Hitschfeld, C., Sánchez C., Benítez, D., Sáenz, L., Contreras, H., Huidobro, C. (2006). "Effect of leuprolide and cetrorelix on cell growth, apoptosis and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma". *Cancer Investigation*, 24(3), 261-268.

Castellón, E., Venegas, K., Sáenz, L., Contreras, H., Huidobro C. (2005). "Secretion of prostatic specific antigen, proliferative activity and androgen response in epithelial–stromal co-cultures from human prostatic carcinoma". *International Journal of Andrology*, 28(1), 39-46.

Chmelar, R., Buchanan, G., Need, EF., Tilley, W., Greenberg, NM. (2007). "Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer". *International Journal of Cancer*, 120(4), 719-733.

Clementi, M., Sánchez, C., Benitez, D., Contreras, HR., Huidobro, C., Cabezas, J., Acevedo, C., Castellón, EA. (2009). "Gonadotropin releasing hormone analogues induce apoptosis by extrinsic pathway involving p53 phosphorylation in primary cell cultures of human prostatic adenocarcinomas". *Prostate*, 69(10), 1025-1033.

Corona, G, Baldi, E., Maggi, M. (2011). "Androgen regulation of prostate cancer: where are we now?" *Journal of Endocrinological Investigation*, 34(3), 232-243.

D'Amico, F., Biancolella, M., Margiotti, K., Reichardt, JK., Novelli, G. (2007). "Genomic biomarkers, androgen pathway and prostate cancer". *Pharmacogenomics*, 8(6), 645-661.

Epstein, JI. (2010). "An update of the Gleason grading system". *Journal of Urology*, 183(2), 433-440.

Garg, G., Singh, D., Saraf, S., Saraf, S. (2006). "Management of benign prostate hyperplasia: an overview of alpha-adrenergic antagonist". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1554-1558.

Imamoto, T., Suzuki, H., Yano, M., Kawamura, K., Kamiya, N., Araki, K., Komiya, A., Nihei, N., Naya, Y., Ichikawa, T. (2008). "The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer". *International Journal of Urology*, 15(6), 472-480.

Karavitis M, Ahmed HU, Abel PD, Hazell S, Winkler MH. (2011). "Tumor focality in prostate cancer: implications for focal therapy". *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(1), 48-55.

Mercado, A., Sánchez, C., Fullá, J., Ledezma, R., Acevedo, C., Cabezas, J., Huidobro, C., Contreras, H., Castellón, EA. (2010). "Expresión y actividad de proteínas de multirresistencia a drogas (MDR) en líneas celulares de cáncer de próstata". *Revista Chilena de Urología*, 75(1), 25-30.

Miki, J. (2010). "Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells". *International Journal of Urology*, 17(2), 139-147.

Mimeault, M., Mehta, PP., Hauke, R., Batra, SK. (2008). "Functions of normal and malignant prostatic stem/progenitor cells in tissue regeneration and cancer progression and novel targeting therapies". *Endocrine Reviews*, 29(2), 234-252.

Moul, JW., Mouraviev, V., Sun, L., Schroeck, FR., Polascik, TJ. (2009). "Prostate cancer: the new landscape". *Current Opinion in Urology*, 19(2), 154-160.

Mouraviev, V., Mayes, JM., Polascik, TJ. (2009). "Pathologic basis of focal therapy for early-stage prostate cancer". *Nature Reviews. Urology*, 6(4), 205-215.

Sánchez, C., Mercado, A., Contreras, HR., Cabezas, J., Huidobro, C., Castellón, EA. (2012). "Pharmacoperone IN3 enhances apoptotic effect of leuprolide in prostate cancer by increasing GnRH receptor in cell membrane". *Anti-Cancer Drugs*, 23(9), 959-969.

Sánchez, C., Mercado, A., Contreras, HR., Mendoza, P., Cabezas, J., Acevedo, C., Huidobro, C., Castellón, EA. (2011). "Chemotherapy

sensitivity recovery of prostate cancer cells by functional inhibition and knock down of multidrug resistance proteins". *Prostate*, 71(16), 1810-1817.

Sánchez, C., Clementi, M., Benitez, D., Contreras, H., Huidobro, C., Castellón, E. (2005). "Effect of GnRH analogues on expression of TrkA and p75 neurotrophin receptors in primary cell cultures from human prostate adenocarcinoma". *Prostate*, 65(3), 195-202.

Sánchez, C., Mendoza, P., Contreras, H., Vergara, J., McCubrey, J., Huidobro, C. and Castellón, EA. (2009). "Expression of multidrug resistance proteins in prostate cancer is related with cell sensitivity to chemotherapeutic drugs". *Prostate*, 69(13), 1448-1459.

Taylor, RA., Risbridger, GP. (2008). "The path toward identifying prostatic stem cells". *Differentiation*, 76(6), 671-681.

Thomson, AA., Marker, PC. (2006). "Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles". *Differentiation*, 74(7), 382-392.

Timms, BG. (2008). "Prostate development: a historical perspective". *Differentiation*, 76(6), 565-577.

Tu, SM., Lin, SH. (2012). "Prostate cancer stem cells". *Clinical Genitourinary Cancer*, 10(2), 69-76.

Wagenlehner, FM., Diemer, T., Naber, KG., Weidner, W. (2008). „Chronic bacterial prostatitis (NIH type II): diagnosis, therapy and influence on the fertility status". *Andrologia*, 40(2), 100-104.

AUTORES

Autores principales por orden alfabético:

Prof. Dr. Enrique A. Castellón

Laboratorio de Andrología Celular y Molecular (LACyM). Programa de Fisiología y Biofísica. Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM). Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile.

Dra. Andreina Cesari

Laboratorio de Biología de Procariotas y Gametas, Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET, Argentina.

Prof. Dr. Miguel Walter Fornés

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Autores Invitados:

Dra. Paola Vanina Boarelli

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Dra. María Eugenia Cabrillana

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Dr. Federico Andrés Hozbor

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-Balcarce.

MS. Alba Verónica Ledesma

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-Balcarce, Argentina.

Dra. María de los Ángeles Monclus

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Dra. Alfonsina Morales

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Lic. Elisa Olivia Pietrobon

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Dra. Tania Estefanía Saez Lancellotti

Área e Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Argentina.

Lic. Lucía Zalazar

Laboratorio de Biología de Procariotas y Gametas, Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET, Argentina.

