



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Modelos experimentales para el estudio de  
receptores de cannabinoides, citoesqueleto  
y motilidad en el espermatozoide humano

Maria Manuela Francou

Tesis

**Doctorales**

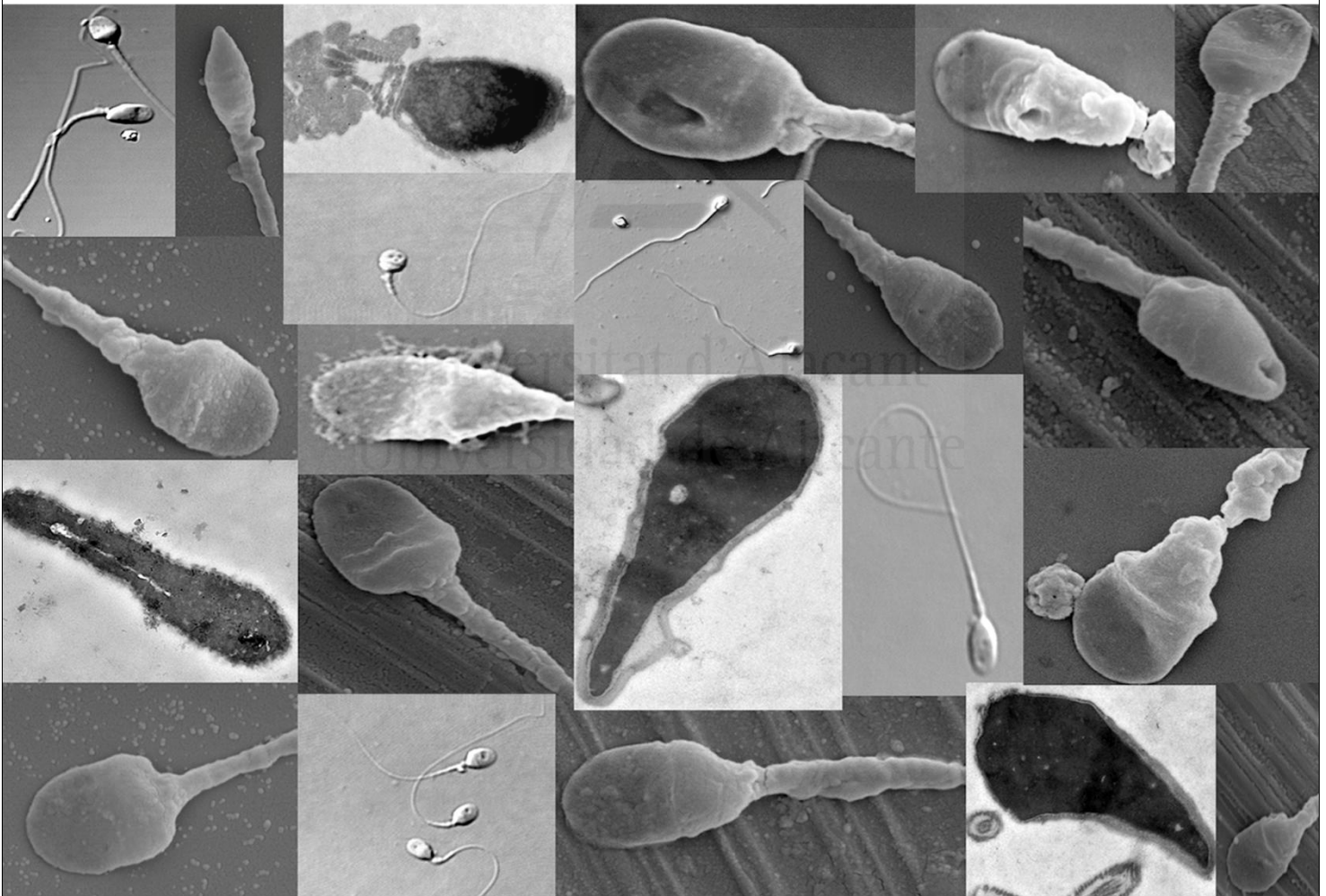
[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE





# Modelos experimentales para el estudio de receptores de cannabinoides, citoesqueleto y motilidad en el espermatozoide humano



*Maria Manuela Francou*

*2012*

# **Modelos experimentales para el estudio de receptores de cannabinoides, citoesqueleto y motilidad en el espermatozoide humano**

**Tesis Doctoral**

Presentada por: **Maria Manuela Francou**

Dirigida por: **Joaquín de Juan Herrero**

**Rafael Bernabeu Pérez**

Programa: **Doctorado en Biotecnología y Biomedicina**

*Alicante, julio 2012*



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos, dirigidos por el Dr. Joaquín de Juan como Investigador Principal:

Proyectos 4-12I, 3-12PA, 2-11I, 1-09I, mediante los correspondientes convenios entre el Instituto Bernabeu y el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

Proyecto Grant UAUSTI10-02 del Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Universidad de Alicante.



# Contenidos

---

## Introducción general

<b>1. Marco conceptual</b> .....	1
1.1. Maduración y capacitación del espermatozoide .....	2
1.2. Cambios moleculares y funcionales producidos durante la capacitación y la reacción acrosómica.....	4
1.2.1. Aumento del calcio intracelular.....	4
1.2.2. Incremento de la fosforilación proteica .....	6
1.2.3. Hiperactivación de la motilidad.....	7
<b>2. Justificación del estudio</b> .....	11

<b>Objetivos</b> .....	13
------------------------	----

## **Modelo experimental 1: *Identificación y localización subcelular de la Glutamina Sintetasa en espermatozoides humanos***

Resumen.....	16
Introducción .....	17
Material y Métodos.....	19
Resultados .....	24
Discusión.....	28

## **Modelo experimental 2: *Expresión y distribución subcelular del receptor de cannabinoide tipo 1 y tipo 2 en espermatozoides humanos frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente***

Resumen.....	31
Introducción .....	32
Material y Métodos.....	34
Resultados .....	39

Discusión.....	45
<b>Modelo experimental 3: Efecto de los endocannabinoides, 2-araquidonilglicerol y 2-araquidonilglicerol éter, en las funciones in vitro del espermatozoide humano</b>	
Resumen.....	49
Introducción .....	50
Material y Métodos.....	53
Resultados .....	58
Discusión.....	64
<b>Modelo experimental 4: Inmunolocalización y cuantificación de <math>\alpha</math>-tubulina en espermatozoides humanos frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente</b>	
Resumen.....	68
Introducción .....	69
Material y Métodos.....	71
Resultados .....	75
Discusión.....	80
<b>Conclusiones.....</b>	<b>84</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>88</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>106</b>

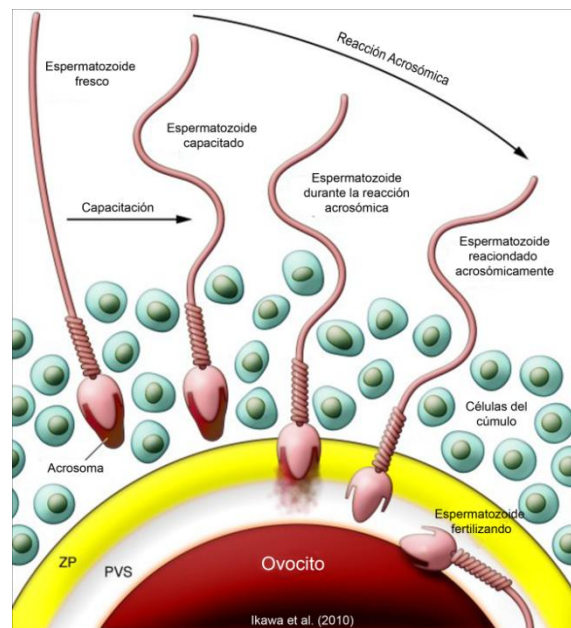


Universitat d'Alacant  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**  
Universidad de Alicante



## 1. Marco conceptual

El proceso de fertilización se lleva a cabo a través dos células, el espermatozoide y el ovocito. La calidad y funcionalidad de ambos gametos es fundamental para el éxito de la vida. Sin embargo, el espermatozoide debe superar muchos más “obstáculos” en su largo camino por el tracto genital femenino [1]. Convencionalmente, la capacidad del espermatozoide de fecundar al ovocito, se analiza a través de un seminograma del eyaculado, evaluando diferentes parámetros como la motilidad, viabilidad, morfología y concentración [2]. Sin embargo, en esta etapa de su maduración los espermatozoides son incapaces de fertilizar al ovocito [3]. Este fue uno de los principales problemas al que se enfrentaron los primeros investigadores, cuando sin éxito intentaban la fecundación de ovocitos de conejos [4]. Hasta que en 1951, el Dr. Chang observó que los espermatozoides recolectados de las trompas de Falopio de mamíferos, presentaban características diferentes a los eyaculados [5]. Posteriormente, en 1952 el Dr. Austin acuñó el término de “capacitación” para identificar a estos espermatozoides [6]. En la actualidad sabemos que la capacidad de fecundación, la adquiere el espermatozoide *in vivo*, en su activación por el tracto genital femenino [7]. La capacitación involucra diversos cambios estructurales, moleculares y funcionales, incluyendo una hiperactivación de la motilidad [8], un aumento de la concentración intracelular del ión calcio [9] y un incremento en la fosforilación proteica [10, 11]. Así, una vez capacitado el espermatozoide puede experimentar la reacción acrosómica. Este evento implica la liberación de enzimas hidrolíticas que le permitirán penetrar en la zona pelúcida y fecundar al ovocito (Fig. 1). Tanto la capacitación como la reacción acrosómica son eventos muy importantes involucrados en la fisiología de la fecundación y en la capacidad fecundante del gameto masculino. Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de los cambios funcionales, estructurales y moleculares que suceden en el proceso de maduración y que lo preparan para la fecundación.

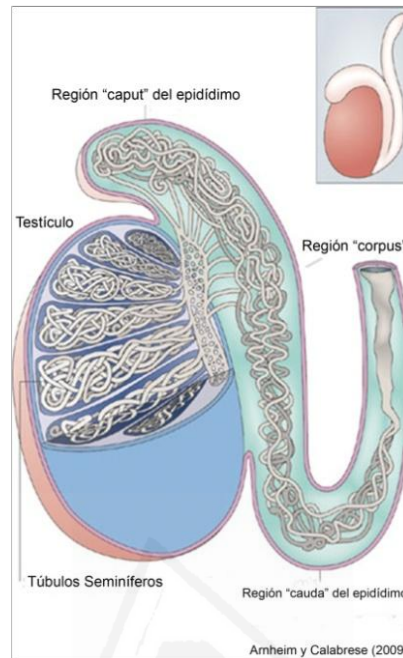


**Figura 1.** Mecanismo de la interacción espermatozoide-ovocito. En el tracto reproductor femenino el espermatozoide sufre la capacitación, la cual le permite experimentar la reacción acrosómica. La reacción acrosómica ocurre cuando el espermatozoide se encuentra con el ovocito. La liberación de las enzimas hidrolíticas localizadas en la parte anterior de su cabeza le permiten penetrar en la zona pelúcida (ZP) y poder llevar a cabo la fertilización. PVS, espacio perivitelino. Adaptado de Ikawa et al., 2010 [1].

### 1.1. Maduración y capacitación del espermatozoide

El espermatozoide en su migración a través del epidídimo sufre un proceso de maduración que incluye cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos [12]. El epidídimo es un órgano del sistema reproductor masculino muy especializado y dividido morfológicamente en tres regiones principales: la cabeza (*caput*), el cuerpo (*corpus*) y la cola (*cauda*) (Fig. 2). Cada una de estas regiones posee distintos perfiles de secreción proteica, creando microambientes esenciales en la maduración de las células germinales [13, 14]. La adquisición de la motilidad progresiva en células espermáticas, es el cambio funcional más importante que ocurre durante la maduración epididimaria [15]. Así, espermatozoides humanos extraídos de la cabeza del epidídimo muestran una limitada motilidad progresiva y son incapaces de experimentar la reacción acrosómica [16-18]. Por otra parte, también se ha demostrado una relación entre la longitud del epidídimo y la capacidad fecundante del espermatozoide. Por ejemplo, pacientes que genéticamente presentan el epidídimo más largo, tienen en ciclos de fecundación

*in vitro*, unas tasas de fertilización y embarazo significativamente superiores a aquellos con la longitud del epidídimo normal [19].

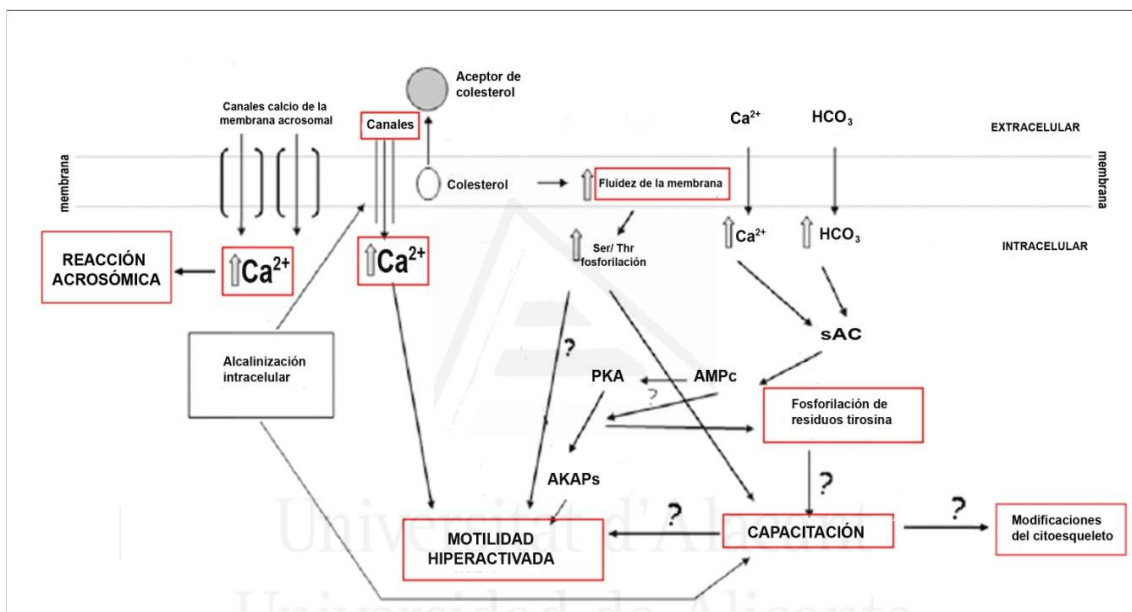


**Figura 2.** Esquema general de las regiones del epidídimo. La región más cerca de los túbulos seminíferos se denomina cabeza (*caput*), la central cuerpo (*corpus*) y la más distal cola (*cauda*). Adaptado de Arnheim *et al.*, 2009 [20].

Una vez en el tracto reproductor femenino el espermatozoide comienza la capacitación. Este proceso se inicia cuando se liberan de los factores decapacitantes, los cuales son en su mayoría son proteínas secretadas por el epidídimo unidas a la membrana plasmática [21]. La capacitación induce diversos cambios en el espermatozoide incluyendo un aumento del calcio intracelular [9], incremento de la fosforilación proteica [10, 11] e hiperactivación de la motilidad [22, 23]. Estos cambios moleculares durante la capacitación, permiten al espermatozoide experimentar la reacción acrosómica [24], una exocitosis de enzimas hidrolíticas localizadas en la parte anterior de la cabeza, que le permitirán penetrar eventualmente en la zona pelúcida que rodea al ovocito [25]. Este evento está íntimamente relacionado diversos cambios moleculares, entre los que se incluyen la apertura de canales de calcio [26] e importantes modificaciones de la arquitectura celular [27-29].

## 1.2. Cambios moleculares y funcionales producidos durante la capacitación y la reacción acrosómica

Durante la capacitación y reacción acrosómica se activan diversos caminos moleculares que producen cambios a nivel funcional y estructural en el espermatozoide. Si bien para su mejor comprensión hemos de analizar independientemente cada uno de ellos; en la célula espermática todos estos caminos se interrelacionan para generar los cambios funcionales que permiten al espermatozoide fertilizar al ovocito (Fig. 3).

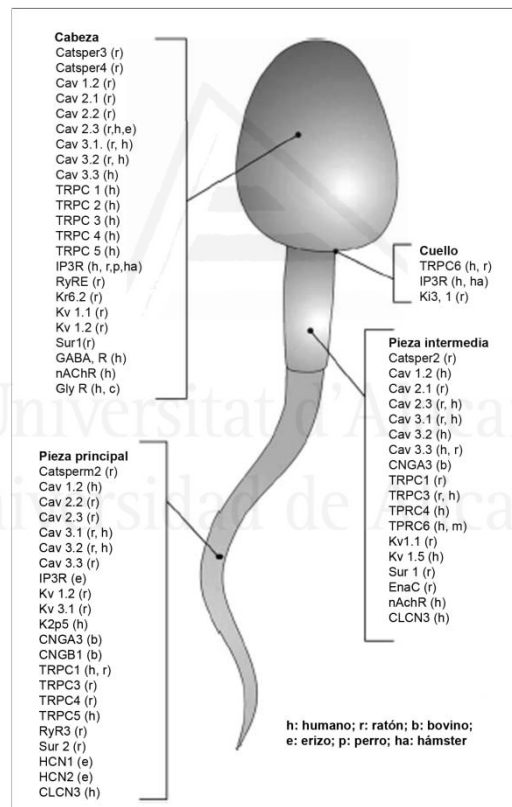


**Figura 3.** Esquema de los principales caminos moleculares involucrados en el proceso de capacitación y reacción acrosómica. Durante la capacitación se necesita en el medio extracelular la presencia de calcio y bicarbonato. En las fases tempranas de la capacitación se produce un aumento de calcio intracelular, que proviene del exterior a través de los canales de calcio. Este calcio genera por un lado una motilidad hiperactivada de los espermatozoides y activa a otros canales de calcio presente en la membrana acrosomal. La entrada masiva de calcio produce la exocitosis del acrosoma. Durante la capacitación, la membrana plasmática pierde colesterol y genera un cambio en su fluidez, causando una redistribución de sus componentes. El calcio y bicarbonato activan a la adenil ciclasa soluble (sAC) la cual por medio del AMPc inducen la actividad de la protein quinasa A (PKA). Esta quinasa activa a otras quinanas (AKAPs) que se encargan de la fosforilación de los residuos tirosina en las proteínas flagelares y que concluyen en la activación de una motilidad hiperactivada. La capacitación también genera la modificación del citoesqueleto, sin embargo el mecanismo molecular implicado no es conocido. Adaptado de Muratori *et al.*, 2009 [30]

### 1.2.1 Aumento del calcio intracelular

El incremento intracelular de la concentración del ión calcio es característico de las fases tempranas de la capacitación [9]. Pero el rol exacto que juega este ión en la capacitación y los mecanismos que disparan su aumento

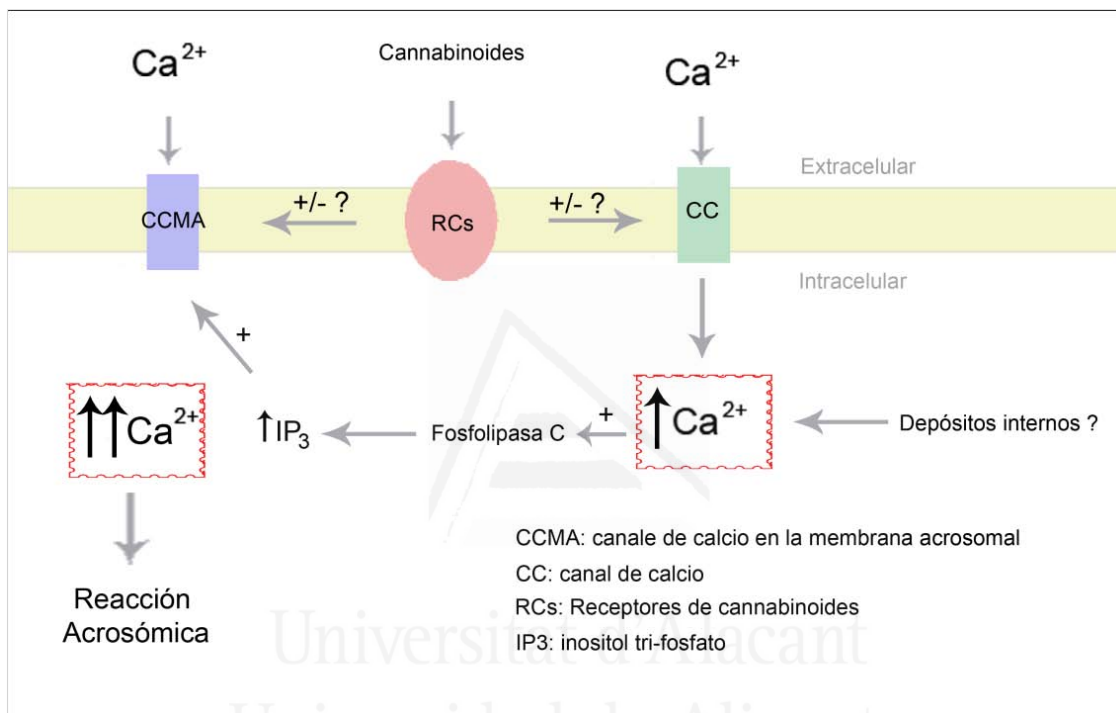
intracelular aún no están claros. Por ejemplo, en espermatozoides de ratones el calcio es necesario para iniciar la fosforilación proteica [31]; sin embargo; en espermatozoides humanos inhibe este proceso[32, 33]. Algunos autores señalan a que la activación de los diferentes canales de calcio presentes en la membrana plasmática del espermatozoide son fundamentales en el mecanismo molecular que inicia la capacitación [34, 35]. En este sentido, se han encontrado una gran variedad de canales de calcio en espermatozoides de diferentes especies (Fig. 4) [36]. Los canales de calcio dependiente de voltaje se localizan principalmente en la región acrosomal [37], sin embargo, otros tipos de canales también están presentes en el flagelo y podrían estar relacionados con la motilidad [38, 39].



**Figura 4.** Distribución espacial y diversidad de canales de calcio en el espermatozoide en diferentes especies. Adaptado de Darszon *et al.*, 2006 [40].

Por otra parte, la concentración de calcio intracelular también juega un papel importante en la reacción acrosómica. El camino molecular que inicia la reacción acrosómica consta de dos etapas. La primera, es un aumento de calcio intracelular asociado a la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje. Y la

segunda, es la apertura de los canales de calcio localizados en la membrana acrosomal, que dispara la entrada masiva de calcio y provoca la exocitosis acrosomal. El mecanismo molecular propuesto se inicia con la primera elevación del calcio que activa la fosfolipasa C generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), y a su vez este funciona como un activador de los canales sensibles a IP3 presentes en la membrana acrosomal (Fig. 5).



**Figura 5.** Mecanismo molecular implicado en la elevación del calcio intracelular y la reacción acrosómica. El mecanismo se inicia con una primera elevación del ión calcio que activa a la fosfolipasa C, la cual genera inositol trifosfato. Este activa a los canales de calcio presentes en la membrana acrosomal, provocando una entrada masiva de calcio que inicia la reacción acrosómica.

### 1.2.2. Incremento de la fosforilación proteica

La fosforilación de proteínas es la principal modificación post-translacional implicada en el proceso de capacitación de muchas especies de mamíferos [41-44]. En espermatozoides humanos, la mayoría de las proteínas fosforiladas se encuentran en el flagelo [45, 46], sin embargo en otras especies el incremento de la fosforilación también ocurre en el acrosoma [47]. La fosforilación de proteínas requiere en el medio extracelular la presencia de albúmina y bicarbonato. La albúmina secuestra el colesterol de la membrana plasmática promoviendo el inicio



de la fosforilación [48-50]. Esta pérdida de colesterol produce un cambio en la fluidez de la membrana [51] y la redistribución de muchas proteínas [52, 53]. Por otra parte, el bicarbonato parece ser el responsable del aumento de pH intracelular observado durante la capacitación [54, 55]. Además, la acción de este ión también parece estar relacionada con la síntesis de AMPc, ya que se ha visto que promueve la actividad de la adenil-ciclase soluble (sAC) [56, 57]. El incremento de la fosforilación proteica es regulado por AMPc e involucra a la protein quinasa A (PKA) (Fig. 3) [41, 58, 59]. Sin embargo, la PKA no es capaz de realizar la fosforilación de los residuos tirosina, por lo que otras enzimas quinasas están implicadas en este proceso. Por otra parte, la fosforilación proteica es un factor implicado en la fecundación. Por ejemplo, existe una clara relación entre la fosforilación proteica y la capacidad del espermatozoide de unirse a la zona pelúcida [46]. Además, se ha encontrado que hombres con problemas de fertilidad poseen alteraciones en la capacidad de fosforilar proteínas [60].

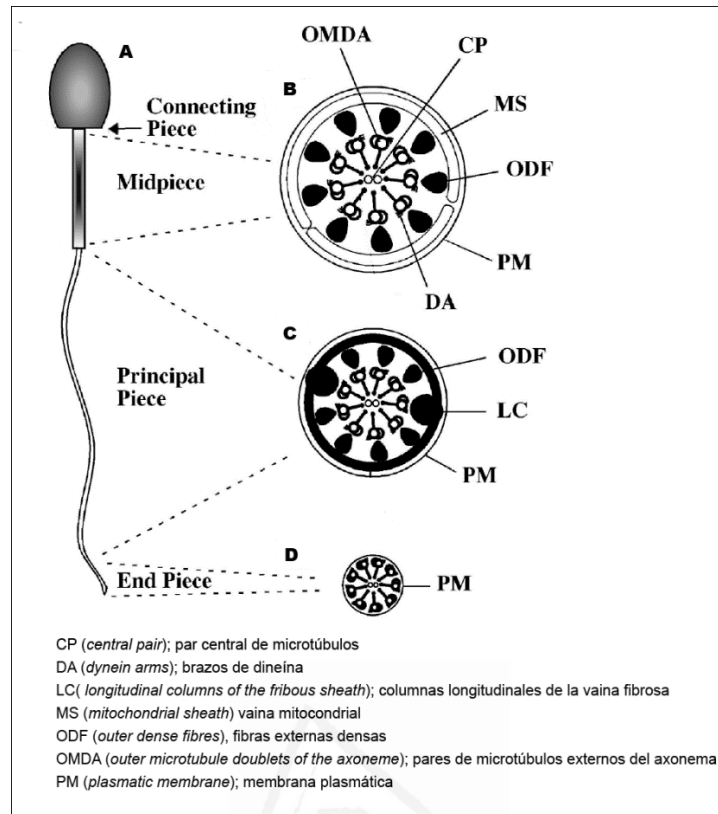
### 1.2.3. Hiperactivación de la motilidad

El espermatozoide humano posee dos tipos de motilidad, por una parte la motilidad activada característica del eyaculado en fresco; y por otra una motilidad hiperactivada, que la adquiere *in vivo* en el tracto genital femenino [22, 23]. Esta hiperactivación se caracteriza por una alta velocidad, gran amplitud y asimetría en el movimiento flagelar, lo que produce en una trayectoria circular o en “forma de ocho” [61, 62]. Sin embargo, este patrón de motilidad es diferente según la especie de mamífero, y parece estar relacionado con la naturaleza proteica del flagelo [63]. La hiperactivación ayuda al espermatozoide a progresar en el viscoso fluido oviductal y eventualmente penetrar en la zona pelúcida del ovocito. Para una mayor comprensión del patrón de motilidad que se produce durante la capacitación, hemos de analizar la organización estructural del flagelo del espermatozoide humano y la regulación de la motilidad hiperactivada que presentan estas células.

### *Organización ultraestructural del flagelo*

El flagelo del espermatozoide humano está dividido en cuatro subdivisiones ultraestructurales: el cuello o pieza conectiva (*connecting piece*), la pieza intermedia (*midpiece*), la pieza principal (*principal piece*) y la pieza final (*end piece*). (Fig. 6). El cuello es la región más proximal a la fosa de implantación de la cabeza espermática. Allí nace el axonema, una estructura que se extiende a lo largo de todo el flagelo y que está formada por un anillo de nueve pares de microtúbulos rodeando a un par central. Hacia el interior y hacia el exterior de cada doblete de microtúbulos se proyectan estructuras o brazos compuestos de dineínas que generan la fuerza móvil del flagelo. La pieza intermedia formada de fibras densas externas (ODFs; *outer dense fibres*) que rodean cada uno de los dobletes de microtúbulos y por una vaina mitocondrial más externa (MS; *mitochondrial sheath*). Las ODFs se extienden desde la pieza intermedia hasta la pieza principal, sin embargo, la MS es una estructura exclusiva de la pieza intermedia. En el principio de la pieza principal, la MS y dos de las ODFs son remplazadas por dos columnas longitudinales de vaina fibrosa (FS; *fibrous sheath*), la cual representa una estructura típica de esta zona del flagelo. Las ODFs y la MS terminan en la pieza principal del flagelo y comienza la siguiente subdivisión; la pieza final. Esta zona solo posee el axonema rodeado por la membrana plasmática (Fig. 6).

El axonema es el encargado del movimiento del flagelo y está formado por subunidades de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Esta estructura está asociada a las dineínas, que son las proteínas encargadas del movimiento. Así, cuando la dineína ATPasa es activada causa la contracción de un par de microtúbulos y esta onda es expandida por todo el flagelo produciendo el movimiento [64, 65]. Por otra parte, la energía necesaria para el movimiento la producen las mitocondrias localizadas en la pieza intermedia del flagelo a través de la generación de ATP por la respiración aeróbica [66]. Sin embargo, el ATP producido por las mitocondrias de la pieza intermedia, parece no ser suficiente para satisfacer el gran requerimiento energético de las dineínas axonales en la generación del movimiento. Además, se ha demostrado que el ATP producido en la pieza intermedia no es capaz de difundir a través del flagelo tan rápidamente como es necesario [67].



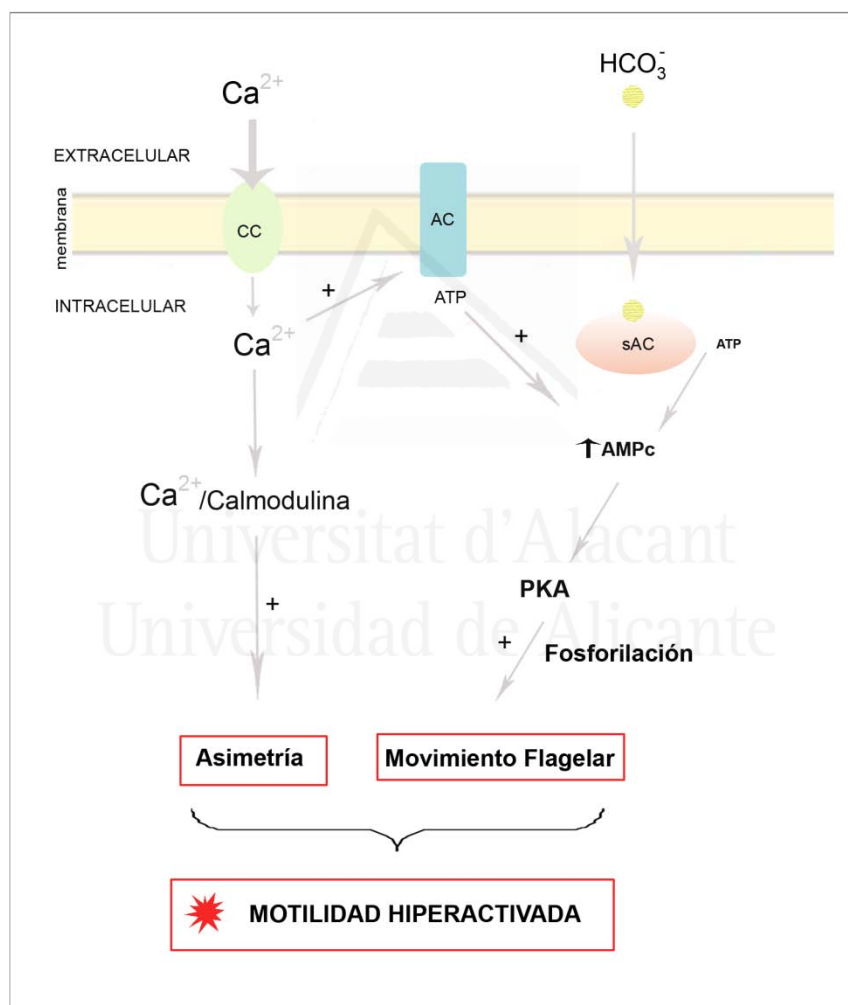
**Figura 6.** Representación esquemática de la ultraestructura del flagelo. (A) El flagelo del espermatozoide de mamíferos es dividido en cuatro partes: el cuello (*connecting piece*), la pieza intermedia (*midpiece*), la pieza principal (*principal piece*) y la pieza final (*end piece*). (B) Esquema de la estructura de la pieza intermedia, constituida por un par central de microtúbulos (CP) rodeado por nueve pares externos (OMDA). Los microtúbulos están asociados a los brazos de dineína (DA). Rodeando a toda esta estructura se encuentra las fibras externas densas (ODF), la vaina mitocondrial (MS) y la membrana plasmática (PM). (C) Esquema de la estructura de la pieza principal, constituida por el axonema en la región central rodeado por las ODFs y la MS. (D) Esquema de la estructura de la pieza final, formada por el axonema rodeado por la PM. Adaptado de Turner; 2003 [68].

Universidad de Alicante

### Regulación molecular de la motilidad hiperactivada

La regulación de la motilidad hiperactivada en el espermatozoide se produce a través de dos caminos moleculares principales, AMPc/PKA (proteín quinasa A) y el calcio intracelular [23, 69-71]. El AMPc dependiente de la fosforilación de proteínas flagelares es el responsable de la iniciación y mantenimiento de motilidad espermática hiperactivada en mamíferos [65, 72]. El AMPc producido por la adenil ciclasa de membrana (AC) o la soluble (sAC), activa la PKA, y esta produce una fosforilación de los residuos serina/treonina de sus proteínas blanco. Estas proteínas en su mecanismo molecular activan a otras tirosinas quinasas que se encargan de la fosforilación de los residuos tirosina de las proteínas localizadas en el flagelo del espermatozoide [73, 74]. Por otra parte,

el calcio extracelular también regula la motilidad hiperactivada en espermatozoides [23, 69, 71]. El calcio tiene diferentes vías de acción, pero una de la más importante es la regulación de la AC. Esta enzima genera un aumento del AMPc que activa la PKA la cual provoca un aumento del movimiento flagelar. Por otra parte, la asimetría observada en los espermatozoides hiperactivados es regulada por la calmodulina en presencia de calcio [75]. Así el incremento del movimiento flagelar y la asimetría producen un espermatozoide con motilidad hiperactivada (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquema de los mecanismos moleculares involucrados en la hiperactivación de la motilidad espermática. Los dos caminos moleculares involucrados son el AMPc/PKA (proteín kinasa A) y el calcio intracelular. Tanto la adenil ciclasa de membrana (AC) como la adenil ciclasa soluble (sAC) generan un aumento de AMPc. Este aumento del AMPc, activa por medio de la PKA la fosforilación proteica que concluye en un aumento del movimiento flagelar. Por otra parte, el calcio intracelular aumenta por el ingreso a través de los canales de calcio de membrana (CC). Este ión incrementa la actividad de la AC y promueve el movimiento asimétrico a través del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. El aumento del movimiento flagelar y la asimetría observada, son características de un espermatozoide hiperactivado.

## 2. Justificación del estudio

En las últimas décadas se ha observado un declive de la calidad seminal y un aumento de las alteraciones en los órganos reproductivos, lo que ha causado una disminución en el potencial fértil de los hombres [76-78]. Estos hechos pueden estar relacionados con diversos factores incluyendo los genéticos, ambientales o de estilo de vida. Así, se ha demostrado en diversos estudios que el consumo de tabaco, alcohol y otras drogas como la marihuana afectan negativamente a los parámetros seminales [79-81]. Este declive del potencial fértil masculino ha llevado a un aumento de las técnicas de reproducción asistida y concretamente de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Esta técnica es esencial en parejas donde el factor determinante de la infertilidad es el masculino, como ocurre en las oligozoospermias severas [82, 83]. Sin embargo, la principal desventaja de la ICSI es que evita la selección natural de los espermatozoides fisiológica o genéticamente anormales [84]. En este sentido, la elección del espermatozoide a microinyectar se realiza mediante un criterio basado en parámetros morfológicos y de motilidad [85]. Si bien, esta selección arbitraria no es suficiente para la elección del mejor espermatozoide dentro de una muestra heterogénea, es la única posible hasta el momento. Por esta razón, se necesitan estudios donde se determinen los cambios celulares, moleculares y funcionales que consiguen *in vivo* que una pequeña población de espermatozoides sean capaces de fertilizar al ovocito. El conocimiento de estos eventos y la influencia de ciertas moléculas sobre ellos, nos permitirán profundizar en el conocimiento de la capacidad fecundante del espermatozoide humano.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **OBJETIVOS**



# Objetivos

---


Los cambios moleculares y funcionales producidos en el espermatozoide humano a través de su paso por el tracto reproductor femenino son muy importantes para conocer detalladamente la fisiología de la reproducción. Así, el principal objetivo de esta tesis doctoral fue determinar novedosos cambios moleculares que se producen durante la capacitación y reacción acrosómica del espermatozoide humano. Estos cambios incluyeron la redistribución de receptores membranales, cambios en proteínas del citoesqueleto y localización de enzimas relacionadas con el metabolismo energético. En particular los objetivos específicos de esta tesis doctoral fueron:

1. Caracterizar mediante inmunocitoquímica la novedosa presencia de glutamina sintetasa en el espermatozoide humano y evaluar la proporción de espermatozoides inmunoreactivos en muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica.
2. Evaluar la presencia y distribución del receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), en espermatozoides humanos frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Además, cuantificar la proporción de espermatozoides reactivos a través de patrones de localización de cada tipo de receptor.
3. Determinar el efecto de los endocannabinoides 2-araquidonilglicerol (2-AG) y 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE) en las funciones *in vitro* y características moleculares del espermatozoide humano. Estas incluyeron evaluación de la motilidad, viabilidad, reacción acrosómica y fosforilación proteica de muestras frescas y capacitadas.

4. Conocer los cambios que se producen en el citoesqueleto a través de la localización subcelular y cuantificación del área inmunoreactiva de  $\alpha$ -tubulina en espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**Identificación y localización subcelular de la  
Glutamina Sintetasa en espermatozoides  
humanos**

Universitat d'Alicant  
Universidad de Alicante

---

## Resumen

---

La glutamina sintetasa (GS) cataliza la síntesis *de novo* de glutamina; este amino ácido ha sido asociado a la motilidad en espermatozoides de mamíferos. Sin embargo, no existe información disponible sobre la presencia de GS en el espermatozoide humano. El principal objetivo de este estudio fue demostrar la presencia y localización subcelular de la GS en muestras espermáticas frescas, capacitadas y con reacción acrosómica. En estas tres condiciones, hemos detectado mediante Western blot una banda correspondiente al peso molecular de la GS. Por otra parte, el análisis confocal reveló la inmunoreactividad de la GS en la parte post-acrosomal de las células espermáticas. Además, el doble marcaje con actina o calicina demostró que la GS está confinada en la región post-acrosomal de la teca perinuclear. Este dato fue validado mediante el análisis ultraestructural. Interesantemente, la fracción de espermatozoides inmunoreactivos para la GS tuvo un incremento significativo en las muestras capacitadas y con reacción acrosómica. Así, nuestros resultados sugieren que el espermatozoide humano contiene GS y podría estar involucrada en los eventos que lo preparan para la fertilización.

Universitat d'Alicante  
Universidad de Alicante

# Introducción

---

La glutamina sintetasa es la única enzima responsable de la síntesis *de novo* de glutamina, que la realiza catalizando la combinación del amonio y glutamato con hidrólisis de ATP [86-88]. Esta enzima se expresa en una gran variedad de tejidos y células del organismo. Por ejemplo, en el cerebro la GS por mucho tiempo fue considerada como un marcador de las células astrogiales, pero hoy se sabe que también la expresan las células de Müller en la retina [89-91]. En el hígado, la GS es detectada en una determinada población celular rodeando a la vena hepática terminal [92]. Además, también la GS está presente en el músculo esquelético [86, 93] y tejido adiposo [94, 95]. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la presencia y localización subcelular de la GS en espermatozoides de mamíferos. Recientemente, la GS ha sido detectada por electroforesis bidimensional en el espermatozoide de búfalo [96].

La GS es esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular ya que juega un rol importante en la detoxificación del amonio y glutamato, el control del redox celular y el balance de energía [86, 97-100]. La detoxificación del amonio y glutamato la realiza principalmente las células glias del cerebro. Estas células se encargan de la rápida eliminación del glutamato que se libera durante las sinapsis neuronales [90]. La actividad de la GS en el cerebro es muy importante, ya que la pérdida de funcionalidad de esta enzima ha sido asociada a enfermedades como el Alzheimer [101-103]. En el músculo esquelético, la GS se encarga de la síntesis del ~70 % de la producción endógena de glutamina, la cual es una fuente de energía en situaciones catabólicas del organismo [104]. Por otra parte, la glutamina es uno de los muchos componentes del plasma seminal [105, 106] y ha sido demostrado que influye en la motilidad de los espermatozoides. Por ejemplo, la adición exógena de glutamina tiene un efecto crioprotector en la motilidad de diferentes especies de mamíferos, incluyendo la humana [107-111]. Además, la actividad de la GS se relaciona con la adquisición de la motilidad espermática en el epidídimo, aumentando desde la región *caput* hacia la *cauda* [112]. Sin embargo, aún no está bien caracterizado el mecanismo molecular por el cual la glutamina influye en la

motilidad de las células espermáticas [109]. En este sentido, los estudios de las fuentes de glutamina en el espermatozoide, podrían proporcionar una primera evidencia del mecanismo molecular involucrado en la relación glutamina-motilidad. Así, el principal objetivo de este estudio fue caracterizar mediante inmunocitoquímica la novedosa presencia de GS en el espermatozoide humano y evaluar la proporción de espermatozoides inmunoreactivos en muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



# Material y Métodos

---

## 1. Muestras seminales

Las muestras seminales fueron obtenidas a partir de donantes sanos (18-35 años de edad; n=5) luego de 3-4 días de abstinencia sexual. Los voluntarios accedieron al uso de sus muestras para fines científicos firmando un consentimiento informado, de acuerdo con los estándares éticos requeridos para tal fin. El Comité de Ética de la Universidad de Alicante aprobó los procedimientos realizados con las muestras biológicas.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos para que se produzca la licuefacción. Luego se realizó un seminograma completo de cada muestra, donde se evaluaron los parámetros: volumen, concentración, licuefacción, pH, motilidad, viabilidad y morfología; clasificándolas como normozoopérmicas de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud [2].

Capacitación. Swim-up. Los espermatozoides fueron lavados dos veces con el medio de cultivo HAM (Gibco, Invitrogen, CA, USA) suplementado con HSA (1% de Albúmina Sérica Humana, 0,003 % de piruvato de sodio, 0,36 % de lactato de sodio, 0,2 % de bicarbonato de sodio) a 37 °C y centrifugados a 400 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de HAM suplementado fresco. Las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, manteniendo el tubo Falcon en una posición a 45°. Luego de transcurrido tiempo de incubación, se recolectó los espermatozoides altamente móviles de la capa superior. La eficiencia de la técnica fue evaluada mediante un microscopio de contraste de fases (Leica DMRB), descartando aquellas muestras que tenían ≤ 95 % de los espermatozoides móviles progresivos.

Reacción Acrosómica. Cada una de las alícuotas de las muestras capacitadas fueron incubadas con una mezcla de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Adrich, SL USA) y CaCl<sub>2</sub>, ambos en una concentración final de 10 μM, durante 60 minutos a 37

°C y 5% CO<sub>2</sub>. La eficacia de la reacción acrosómica fue evaluada mediante la técnica del isocianato de fluoresceína conjugada con la aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA dilución 1:20; Sigma-Adrich) [113]. Las muestras con un porcentaje de espermatozoides reaccionados acrosómicamente menor al 90% fueron excluidas de este grupo de estudio.

## 2. Western Blot

El Western blot fue realizado con los extractos proteicos de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Para ello, cada alícuota fue lavada 2 veces con PBS. Se eliminó el sobrenadante, y se agregó 150 µL de tampón de lisis (1% [v/v] Triton-X100 con 1 % [v/v] cóctel inhibidor de proteasas). Se centrifugó a 10.000 *g* por 10 minutos y se recogió el sobrenadante con las proteínas en suspensión. Como controles positivos se utilizaron proteínas obtenidas del cerebro e hígado de ratón (C57BL/6J), el cual fue gentilmente cedido por el Dr. Eduardo Fernandez. El animal fue sacrificado mediante dislocación cervical y una vez extraídos los órganos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 30 µm y fueron extraídas las proteínas con el tampón de lisis anteriormente mencionado. Las muestras proteicas fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso. La concentración proteica fue medida por el kit de ensayo de la BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Luego de la cuantificación proteica, se ajustó la concentración a 20 µg de proteína en cada alícuota con tampón de lisis. Se mezcló igual cantidad de muestra con el tampón de carga (Laemmli buffer 2X) y fue hervida durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12 % mediante un sistema de minigel (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA). Paralelamente a las muestras se corrió un marcador de peso molecular (Precision plus protein dual color standars; Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA) mediante un sistema de transferencia semi-húmedo (C.B.S. Scientific company, Inc. CA, USA) durante 40 minutos a 400 mA. Esta membrana fue incubada con tampón de bloqueo (TBS-T conteniendo 1% [w/v]

BSA) a 4 °C toda la noche. La incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-GS (G2781, Sigma Aldrich MO, USA) (1:10.000 en tampón de bloqueo) se realizó a temperatura ambiente por 1 hora. Paralelamente, se realizó un control negativo donde se omitió el anticuerpo primario. Se realizaron tres lavados con TBS-T y luego la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (1:2.000) (Invitrogen, CA, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-T y se revelaron las bandas proteicas mediante una mezcla de DAB (0,05 %) (3,3-Diaminobencidina; Sigma-Adrich, SL, USA) y peróxido de hidrógeno (0,015 %).

### 3. Inmunocitoquímica

Los espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica fueron fijados en cubreobjetos (8mm diámetro) con paraformaldehído (4 % [v/v]) durante 15 min. Cada muestra fue lavada dos veces con PBS e incubada con tampón de bloqueo (1% [p/v] BSA y 10% [v/v] suero fetal bovino) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal anti-GS (G2781, Sigma Aldrich MO, USA) (1:5.000 en tampón de bloqueo) a 4 °C durante toda la noche. Paralelamente se realizó de cada muestra un control negativo donde el anticuerpo primario fue reemplazado por solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) e incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo DyLight 549 (711-505-152, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:500 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) y se montó las muestras con un medio de montaje Vecta Shield (Vector laboratories LTD., UK) con DAPI (1% [v/v]) (4',6-Diamino-2-fenil-indol; Sigma-Adrich, SL, USA), para visualizar los núcleos espermáticos.

Para el doble marcaje las muestras fueron incubadas con una mezcla de GS y los siguientes anticuerpos: anti  $\alpha$ -tubulina (T6199, Sigma Aldrich MO, USA) (dilución 1:500) o anti-calicina (sc-162627, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (dilución 1:100). Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y luego incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario anti-

cabra DyLight 488 (705-485-147, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (dilución 1:500) para la calicina; o con el anti-ratón DyLight 488 (711-205-152, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (dilución 1:500) para la  $\alpha$ -tubulina.

Para la detección de la F-actina se realizó la incubación durante 1 hora de las muestras con faloidina conjugada con FITC (P5282, Sigma Aldrich MO, USA) (dilución 1:50). Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS por 5 minutos y montadas con Vectashield-DAPI. Los controles negativos fueron realizados omitiendo el anticuerpo primario.

#### **4. Procesamiento de imágenes**

La inmunofluorescencia fue analizada utilizando un microscopio de láser confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). El marcaje con DyLight 549 fue excitado usando el láser de He/Ne a 543 nm; para el DyLight 488 y FITC fue utilizado el láser de Argón a 488 nm y para el DAPI el láser unido al diodo de 405 nm. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Leica TCS SP2-PC. El ajuste del brillo y contraste fue realizado con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Para las imágenes en tres dimensiones, cada sección óptica fue deconvolucionada (usando el módulo de deconvolución del programa Leica TCS SP2-PC) y reconstruida en tres dimensiones usando el módulo de vista en 3D del programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

#### **5. Microscopía electrónica de transmisión**

Las muestras espermáticas fueron fijadas con una mezcla de paraformaldehído (2% [v/v] y glutaraldehído (0,02% [v/v]) por 1 hora a 4°C. Se eliminó el fijador lavando 3 veces con PBS y eliminando el sobrenadante. Las células fueron incluidas en agarosa (2% [p/v] en PBS) y deshidratadas con etanol (50%/70%/100% progresivamente) durante 15 minutos cada uno. Luego fueron

incluidas en resina LRwhite (London Resin Company, London, UK) y polimerizadas toda la noche a 55 °C. Con el ultramicrotomo se realizaron secciones ultrafinas (70 nm) de cada muestra y fueron adheridas a rejillas de níquel (G200-Ni, Electrón Microscopia Sienes, PA, USA). Estas secciones fueron lavadas dos veces en PBS e incubadas con tampón de bloqueo (1% [p/v] BSA) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-GS (G2781, Sigma Aldrich MO, USA) (1:500 en tampón de bloqueo) toda la noche a 4 °C. El control negativo fue realizado remplazando el anticuerpo primario por el tampón de bloqueo. Las secciones fueron lavadas tres veces con PBS (3 X 5 min) e incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con oro coloidal (12 nm) (711-205-152, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:400 en PBS) por 60 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS (3 X 5 min) y una vez secas se contrastaron las rejillas con acetato de uranilo (10 %). Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio electrónico de transmisión (Philips Tecnai 12, Philips, Amsterdeam, The Netherlands).

## **6. Análisis Estadístico y cuantificación de espermatozoides**

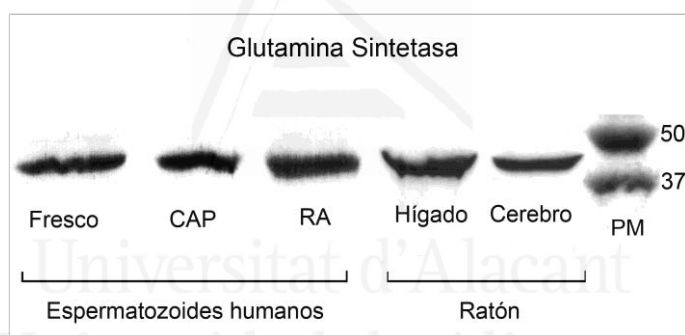
El porcentaje de espermatozoides GS+, GS- y GS' fueron cuantificados en muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica. Se contaron 200 espermatozoides de cada alícuota analizada. El porcentaje se expresó como la media  $\pm$  el error estándar. Se realizó la prueba-T de Student para examinar la diferencia entre dos medias (fresco/capacitado; fresco/reacción acrosómica o capacitado/reacción acrosómica). Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS (SPSS para Windows V15.0). La diferencias fueron consideradas como significativas cuando  $p < 0,05$ .

# Resultados

---

## 1. Análisis por Western blot de la GS en espermatozoides humanos

En primer lugar hemos analizado la presencia de GS mediante Western blot en los extractos proteicos de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo anti-GS policlonal. Hemos detectado una banda inmunoreactiva con un peso molecular de 45 KDa en las muestras de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Una banda similar fue observada en los controles positivos realizados con hígado y cerebro de ratón (Fig. 1). No se observó ningún marcaje para la GS en los controles negativos.



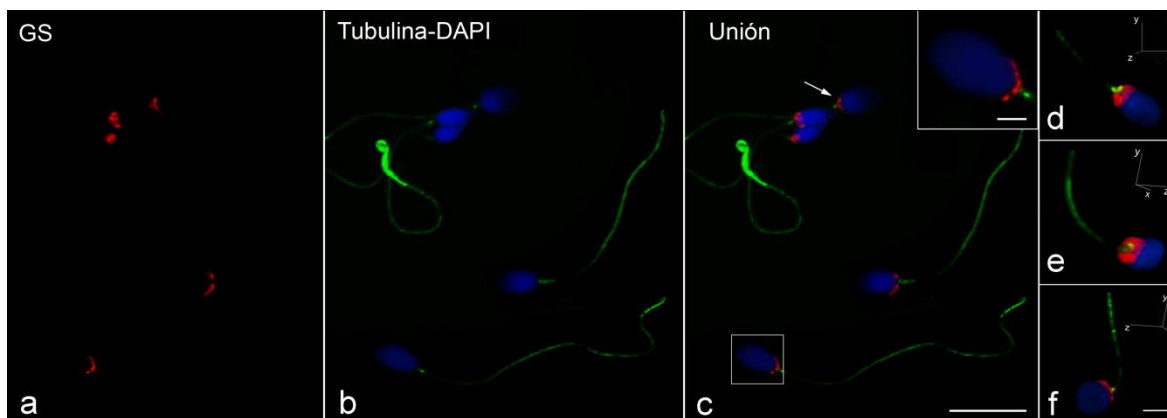
**Figura 1.** Análisis por Western blot de la GS en espermatozoides humanos frescos, capacitados (CAP) y con reacción acrosómica (RA). En los tres extractos proteicos fue detectada una banda inmunoreactiva para GS con un peso molecular aproximado de 45 KDa. Como controles positivos fueron usadas proteínas extraídas del hígado y cerebro de ratón. PM, marcador de peso molecular (KDa).

## 2. Inmunoreactividad de la GS en espermatozoides humanos

En este estudio hemos investigado el patrón de expresión de la GS mediante inmunocitoquímica en muestras espermáticas. Así, hemos detectado la GS en la región post-acrosomal de la cabeza de los espermatozoides, cerca de la pieza conectiva (Fig. 2a-c). El análisis en tres dimensiones mostró que el área inmunoreactiva para la GS rodea al núcleo en la región post-acrosomal, en una especie de "envoltorio" (Fig. 2d-f). Este patrón (GS+) fue predominante, constituyendo el 96% de los espermatozoides inmunoreactivos. Sin embargo,



también se encontró un infrecuente patrón secundario de GS (GS'), en donde la enzima fue localizada en la parte acrosomal de la cabeza.

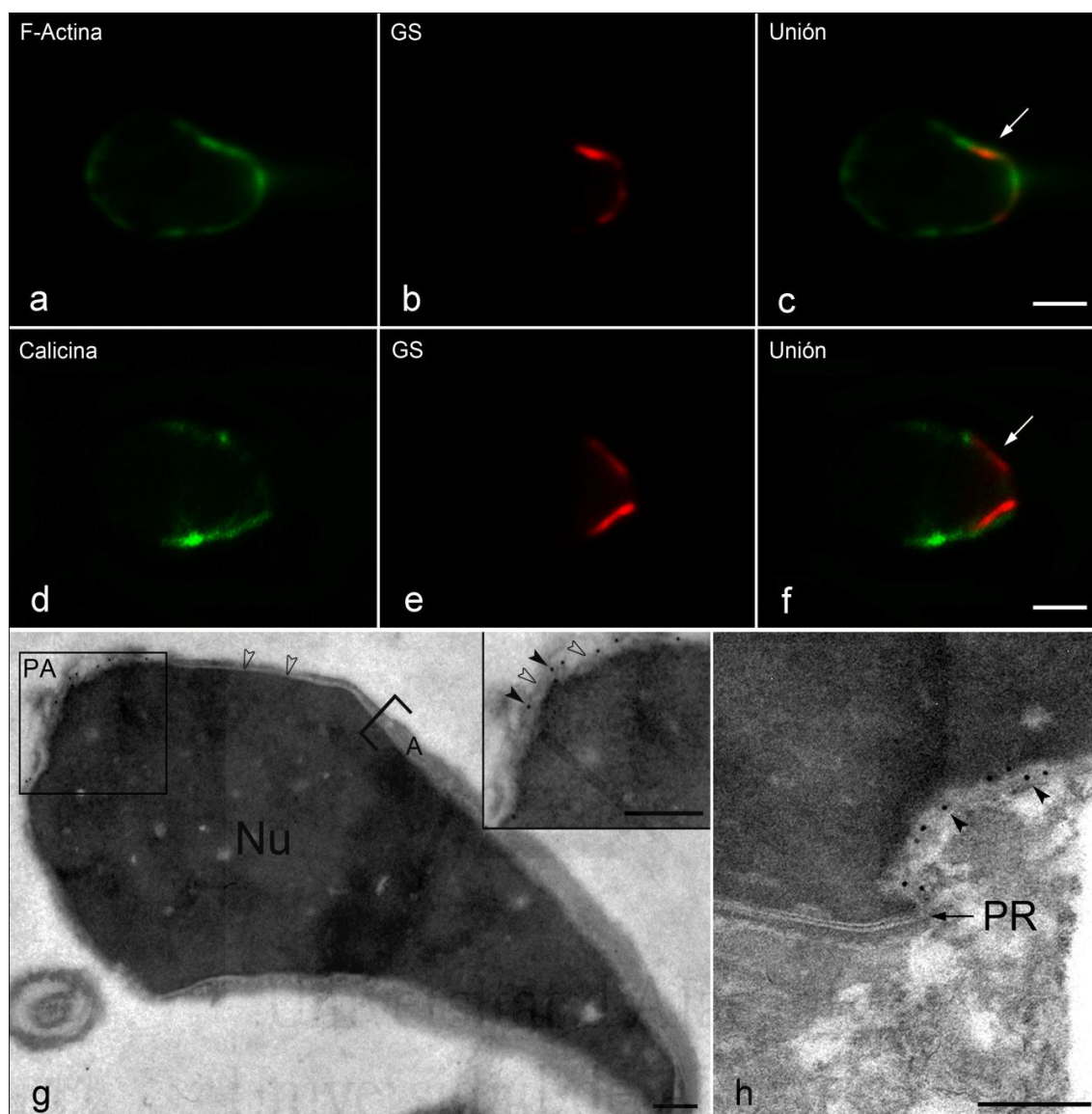


**Figura 2.** Micrografías confocales de espermatozoides humanos con marcaje para GS,  $\alpha$ -tubulina y contrastados nuclearmente con DAPI. **(a)** Inmunoreactividad de la GS (rojo). **(b)** Flagelos espermáticos marcados con  $\alpha$ -tubulina (verde) y el núcleo revelado con DAPI (azul). **(c)** En la superposición de los tres canales, se observó que la inmunoreactividad de la GS se encuentra en la región post-acrosomal de la cabeza (flecha). **(d-f)** Las vistas tridimensionales demostraron que la GS se encuentra rodeando al núcleo. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$  **(c)**, 5  $\mu\text{m}$  **(f)** y 2  $\mu\text{m}$  en la magnificación.

### 3. Localización subcelular de la GS en el espermatozoide humano

Nuestros datos inmunocitoquímicos sugieren que la GS se encuentra en la teca perinuclear (PT), rodeando al núcleo espermático. Así, para comprobar esta hipótesis, hemos realizado un doble marcaje de GS y F-actina o calicina, ambos marcadores moleculares de la PT humana [114-116]. El marcaje con actina reveló la PT en la cabeza del espermatozoide (Fig. 3a). Además, el doble marcaje GS-actina mostró que esta enzima se encuentra solo en la región post-acrosomal de la PT (PAS-PT; Fig. 3c). Este resultado fue confirmado con el inmunomarcaje de calicina-GS (Fig. 3f), ya que la calicina es un marcador específico de la PAS-PT [114, 117].

Estos datos inmunofluorescentes fueron confirmados mediante el estudio ultra-estructural, usando oro coloidal. La GS fue detectada solo en la PAS-PT (Fig. 3g), con enriquecimiento de la región cerca del anillo posterior (Fig. 3h). No se observó inmunoreactividad en otras estructuras espermáticas.

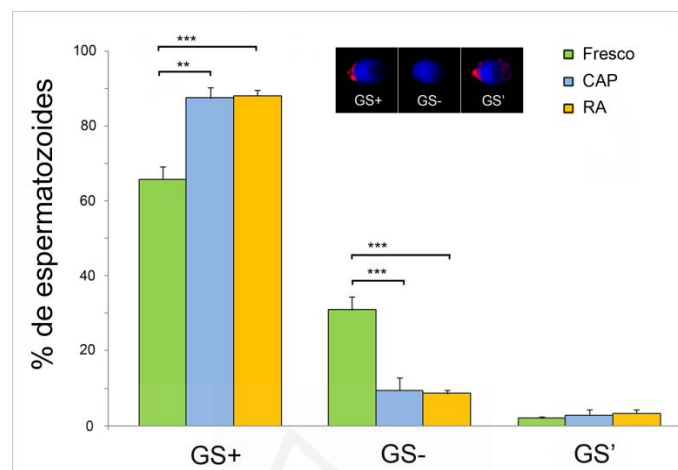


**Figura 3.** Micrografías confocales de espermatozoides humanos con doble marcaje para GS y actina **(a-c)** o calicina **(d-f)**. El marcaje con actina reveló la teca perinuclear (PT) rodeando al núcleo. **(d)** El inmunomarcaje con calicina mostró la región post-acrosomal de la PT (PAS-PT). **(c, f)** La doble exposición demostró que la GS solo está presente en la PAS-PT (flechas). **(g, h)** Localización ultra-estructural de la GS en el espermatozoide humano. **(g)** Sección sagital de un espermatozoide humano marcado con oro coloidal donde se observó la GS en la región post-acrosomal de la cabeza. En el rectángulo se observa una mayor magnificación. La inmunoreactividad de la GS (flechas rellenas) fue detectada principalmente en la PAS-PT (flechas vacías). A, acrosoma; Nu, núcleo; PA, región post-acrosomal; PR, anillo posterior. Barra de escala 2  $\mu\text{m}$  (c, f), 0,2  $\mu\text{m}$  (g, h).

#### 4. Cuantificación de los espermatozoides inmunoreactivos para GS en muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica

La fracción de GS+, GS- y GS' fue evaluada en muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica (Fig. 4). En muestras frescas, el porcentaje de espermatozoides GS+ fue  $67,6 \pm 3,0\%$  y aumentó significativamente en muestras

capacitadas ( $87,3 \pm 1,7\%$ ) y con reacción acrosómica ( $89,7 \pm 0,9\%$ ). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides GS', entre las tres condiciones estudiadas (muestras frescas  $2,9 \pm 0,6 \%$ ; capacitadas  $4,4 \pm 1,3\%$ ; con reacción acrosómica  $4,0 \pm 0,9\%$ ).



**Figura 4.** Porcentaje de GS+, GS- y GS' en espermatozoides frescos, capacitados (CAP) y con reacción acrosómica (RA). La fracción de GS+ se incrementó significativamente en muestras capacitadas y con reacción acrosómica. No existieron diferencias significativas entre los espermatozoides GS'. Prueba-T \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## Discusión

---

Este estudio ha proporcionado la primera evidencia de que el espermatozoide humano contiene GS. De acuerdo con lo encontrado en el espermatozoide de búfalo [96] y a través del análisis por Western blot hemos detectado una banda de ~ 45 KDa correspondiente a la GS. La presencia de GS fue confirmada por estudios confocales y ultraestructurales, los cuales revelaron la inmunoreactividad de la GS en la región post-acrosomal de la cabeza de los espermatozoides. Así, justificados por esta evidencia podríamos agregar al espermatozoide humano a aquellas localizaciones donde está presente la GS como el cerebro [89, 90], hígado [92, 98] o músculo esquelético [86, 93].

Nuestros datos inmunocitoquímicos demostraron un enriquecimiento de la GS en la región de la PAS-PT. La PAS-PT es el principal componente del citoesqueleto de la cabeza de los espermatozoides [117, 118], como puede ser inferido de su contenido proteico formado por actina [115, 119], ciliarina I/II [120, 121], Arp-T1/T2 [122] y calicina [114, 116], entre otras. Además, algunas proteínas de naturaleza no citoesquelética también han sido localizadas en la PAS-PT [123, 124]. Sin embargo, aún no sabemos porque la GS está particularmente confinada a esta región. En relación a esto, ha sido demostrado que muchas proteínas de la PAS-PT son sintetizadas en el lóbulo citoplasmático durante la espermatogénesis y transportadas hacia arriba a través del manchete microtubular [123, 124]. Así, un evento similar podría ocurrir con la GS. Además, el estudio de la localización de la GS en la PAS-PT podría ser de especial relevancia, ya que esta región está involucrada en la protección del genoma y la fertilización del ovocito [117, 125-127].

La fracción de espermatozoides GS+ incrementó significativamente en las muestras capacitadas y con reacción acrosómica. Estas muestras contienen un elevado porcentaje de espermatozoides altamente móviles ya que fueron seleccionadas a través de la técnica del *swim-up* [128]. Así nuestros resultados sugieren que la GS está involucrada con la motilidad y diversas investigaciones

avalan esta hipótesis. Por ejemplo, ha sido demostrado que la actividad de la GS se relaciona con la adquisición de la motilidad en el epidídimo, aumentando desde la región “*cauda*” hacia la “*caput*” [112]. Además, la adición exógena de glutamina tiene un efecto crioprotector en la motilidad espermática de diferentes mamíferos, incluyendo caballos [109], cerdos [108], cabras [107], ovejas [111] y hombres [110]. Al contrario, los altos niveles de glutamato en el plasma seminal han sido relacionados con una baja motilidad en espermatozoides de gallos [129]. A pesar de esta evidencia, aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual la GS parece influir en la motilidad. En este sentido, similar a lo que ocurre en otros tejidos humanos, la GS podría mediar en el balance de la energía [86, 130] y/o en la detoxificación celular a través de la eliminación de glutamato y amonio [90, 92]. Por otra parte, el espermatozoide es capaz de sintetizar pirimidina a partir de glutamina [131, 132], y este nucleótido también ha sido relacionado con la motilidad en espermatozoides humanos [133, 134]. Sin embargo, serán necesarios más estudios para esclarecer el rol que juega la GS en la motilidad espermática.

En conclusión, hemos descrito por primera vez la presencia de GS en el espermatozoide humano. Esta enzima ha sido detectada en la región post-acrosomal, concretamente en la PAS-PT, el principal componente del citoesqueleto en cabeza del espermatozoide. Además, la fracción de espermatozoides inmunoreactivos para la GS fue significativamente mayor en muestras capacitadas y con reacción acrosómica, sugiriendo un posible rol de la GS en la motilidad y en los eventos relacionados con la fertilización.

**Expresión y distribución subcelular del  
receptor de cannabinoide tipo 1 y tipo 2 en  
espermatozoides humanos frescos, capacitados  
y reaccionados acrosómicamente**

---

## Resumen

---

Los receptores de cannabinoides son los encargados de mediar los efectos de los cannabinoides en muchas células del organismo. En el espermatozoide, el sistema de endocannabinoides regula muchos procesos y funciones incluyendo la motilidad, capacitación y reacción acrosómica. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y la localización subcelular del receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), en espermatozoides humanos frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Mediante Western blot hemos detectado bandas inmunoreactivas para el CB1 y CB2, en los extractos proteicos provenientes de espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente. En cuanto a la distribución subcelular, nuestros datos de microscopía confocal y electrónica mostraron que en espermatozoides frescos y capacitados el CB1 se localizó principalmente en la región post-acrosomal; y el CB2 en la región post-acrosomal y pieza intermedia. Sin embargo, el flagelo fue la principal zona de inmunoreactividad del CB1 y CB2 en espermatozoides reaccionados acrosómicamente. Nuestros datos confirman que el espermatozoide humano expresa ambos tipos de receptores y sugieren que existe una redistribución del CB1 y CB2 cuando atraviesa los estados funcionales previos a la interacción con el ovocito.

# Introducción

---

Los cannabinoides son los componentes activos derivados de la planta de marihuana ("*cannabis sativa*") [135, 136]. Sin embargo, los organismos sintetizan endógenamente un grupo de ácidos poliinsaturados denominados endocannabinoides, los cuales presentan propiedades químicas y funcionales similares a los cannabinoides [137]. Tanto los cannabinoides como los endocannabinoides, median sus efectos uniéndose a dos tipos de receptores: el receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) y el receptor de cannabinoide tipo 2 (CB2) [138]. Estos tienen una estructura típica de los receptores asociados a proteínas G y comparten una homología del 48 % en la composición de sus aminoácidos [139]. En la naturaleza la distribución del CB1 y CB2 es muy diversa, incluyendo mamíferos [140], peces [141], invertebrados [142] y plantas superiores [143]. La conservación de estos receptores en la escala filogenética podría indicar el origen ancestral del sistema de endocannabinoides [144]. En humanos, el CB1 es el más abundante en el sistema nervioso central [145] y en tejidos periféricos como el hígado [146], corazón [147], testículo [148] y útero [149]; en cambio el CB2 esta presente principalmente en el sistema inmune [139]. En un principio se pensaba que el espermatozoide solo expresaba el CB1, pero estudios posteriores demostraron la presencia del CB2 en su membrana plasmática [150, 151]. La localización subcelular de estos receptores en el espermatozoide es muy controversial. Algunos autores los sitúan solo en la región post-acrosomal y pieza intermedia [150, 152], mientras que otros también observaron inmunoreactividad en la región acrosomal y flagelo [151, 153]. Si bien la distribución del CB1 y CB2 en espermatozoides frescos ya ha sido descripta, aún no se conoce su localización en espermatozoides capacitados y reaccionados acrosómicamente.

Los receptores de cannabinoides están estrechamente relacionados con funciones y procesos importantes del espermatozoide incluyendo la motilidad, capacitación y reacción acrosómica. Por ejemplo, la activación de estos receptores



produce una disminución de la motilidad progresiva [150, 152]. Además, en ratones *knock out* para el CB1, se observó una temprana adquisición de la motilidad, cuando aún no habían atravesado el epidídimo [154]. También se ha demostrado que la activación del CB1 inhibe la capacitación [155], y que este evento necesita del ingreso de calcio a las células espermáticas [3]. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual los receptores de cannabinoides inhiben la capacitación, diferentes estudios muestran que molecularmente actúan regulando la apertura de diferentes canales de calcio [156, 157]. Por otra parte, la activación del CB1 también produce una inhibición de la reacción acrosómica en espermatozoides, tanto de forma espontánea como inducida por ionóforo de calcio [150, 158]. Así, el estudio de la localización subcelular de los receptores de cannabinoides, nos permitirá conocer aún más sobre la regulación del sistema de endocannabinoides en las funciones del espermatozoide humano.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia y distribución del CB1 y CB2 en espermatozoides humanos frescos, capacitados y con reacción acrosómica.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Material y Métodos

---

## 1. Muestras seminales

Las muestras seminales fueron obtenidas del banco de semen del Instituto Bernabeu (Alicante) a partir de donantes sanos (18-35 años de edad; n=15) luego de 3-4 días de abstinencia sexual. Los voluntarios accedieron al uso de sus muestras para fines científicos firmando un consentimiento informado, de acuerdo con los estándares éticos requeridos para tal fin. El Comité de Ética de la Universidad de Alicante aprobó los procedimientos realizados con las muestras biológicas.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos para que se produzca la licuefacción. Luego se realizó un seminograma completo de cada muestra, donde se evaluaron los parámetros: volumen, concentración, licuefacción, pH, motilidad, viabilidad y morfología; clasificándolas como normozoopérmicas de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud [2].

Capacitación. Swim-up. Los espermatozoides fueron lavados dos veces con el medio de cultivo HAM (Gibco, Invitrogen, CA, USA) a 37 °C y centrifugados a 400 *g* durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de HAM fresco. Las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, manteniendo el tubo Falcon en una posición a 45°. Luego del tiempo de incubación, se recolectó los espermatozoides de la capa superior del medio de cultivo. La eficiencia de la técnica fue evaluada mediante un microscopio de contraste de fases (Leica DMRB), descartando aquellas muestras que tenían ≤ 95 % de los espermatozoides móviles progresivos.

Reacción Acrosómica. Cada una de las alícuotas de las muestras capacitadas fueron incubadas con una mezcla de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Adrich, SL, USA) y CaCl<sub>2</sub>, ambos en una concentración final de 10 μM, durante 60 minutos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La eficacia de la reacción acrosómica fue evaluada mediante la técnica

del isocianato de fluoresceína conjugada con la aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA dilución 1:20; Sigma-Adrich) [113]. Las muestras con un porcentaje de espermatozoides reaccionados acrosómicamente menor al 90% fueron excluidas de este grupo de estudio.

## **2. Western Blot**

El Western blot fue realizado con los extractos proteicos de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Para ello, cada alícuota fue lavada 2 veces con PBS. Se eliminó el sobrenadante, y se agregó 150  $\mu$ L de tampón de lisis (1% [v/v] Triton-X100 con 1 % [v/v] cóctel inhibidor de proteasas). Se centrifugó a 10.000 *g* por 10 minutos y se recogió el sobrenadante con las proteínas en suspensión. Como controles positivos se utilizaron proteínas obtenidas del cerebro y bazo de ratón (C57), el cual fue gentilmente cedido por el Dr. Eduardo Fernandez perteneciente al grupo de investigación de Neuroingeniería Biomédica y Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernandez. El animal fue sacrificado mediante dislocación cervical y una vez extraídos los órganos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 30  $\mu$ m y fueron extraídas las proteínas con el buffer anteriormente mencionado. Las muestras proteicas fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso. La concentración de proteínas totales de cada muestra fue medida por el kit de ensayo de la BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Luego de la extracción, se ajustó la concentración a 20  $\mu$ g de proteína en cada extracto proteico con tampón de lisis. Se mezcló igual cantidad de muestra con el tampón de carga (Laemmli buffer 2X) y fue hervida durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12 % mediante un sistema de minigel (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA). Paralelamente a las muestras se corrió un marcador de peso molecular (Precision plus protein dual color standars; Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA). Posteriormente las bandas proteicas fueron visualizadas mediante la tinción de azul Commassie Brilliant para evaluar la eficiencia de la electroforesis.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA) mediante un sistema de transferencia semi-húmedo (C.B.S. Scientific company, Inc. CA, USA) durante 40 minutos a 400 mA. Esta membrana fue incubada con tampón de bloqueo (TBS-T conteniendo 1% [w/v] BSA) a 4 °C toda la noche. La incubación con el anticuerpo primario anti-CB1 (sc-20754, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) (1:5.000 en tampón de bloqueo) o anti-CB2 (101550, Cayman Chemicals, MI, USA) (1:10.000 en tampón de bloqueo) se realizó a temperatura ambiente por 1 hora. Paralelamente, se realizó un control negativo donde en la incubación se omitió el anticuerpo primario. Se realizaron tres lavados con TBS-T y luego la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (1:2.000) (G-21234, Invitrogen, CA, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-T y se revelaron las bandas proteicas mediante una mezcla de DAB (0,05 %) (3,3-Diaminobencidina; Sigma-Adrich, SL, USA) y peróxido de hidrógeno (0,015 %).

### 3. Inmunocitoquímica

Los espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y con reacción acrosómica (RA) fueron fijados en cubre objetos (8mm diámetro) con paraformaldehído (4 % [v/v]) durante 15 min. Cada muestra fue lavada dos veces con PBS e incubada con tampón de bloqueo (1% [p/v] BSA y 10% [v/v] suero fetal bovino) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios policlonales anti-CB1 (sc-20754, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) (1:100 en tampón de bloqueo) o anti-CB2 (101550, Cayman Chemicals, MI, USA) (1:500 en tampón de bloqueo) a 4 °C durante toda la noche. Paralelamente se realizaron de cada muestra un control negativo donde el anticuerpo primario fue reemplazado por solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) e incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo DyLight 549 (711-505-152, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:500 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) y se montó las muestras con un medio de montaje Vecta Shield (Vector laboratories LTD., UK) con

DAPI (1% [v/v]) (4',6-Diamino-2-fenil-indol; Sigma-Adrich, SL, USA), para visualizar los núcleos espermáticos.

#### **4. Procesamiento de imágenes**

La inmunofluorescencia fue analizada utilizando un microscopio de láser confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). El marcaje con DyLight 549 fue excitado usando el láser de He/Ne a 543 nm, y para la detección del DAPI fue utilizado el láser unido al diodo de 405 nm. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Leica TCS SP2-PC. El ajuste del brillo y contraste fue realizado con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

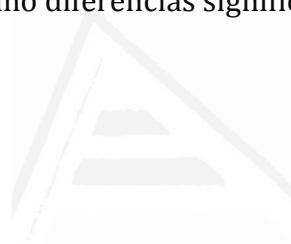
#### **5. Microscopía electrónica de transmisión**

Las muestras espermáticas fueron fijadas con una mezcla de paraformaldehído (2% [v/v] y glutaraldehído (0,02% [v/v]) por 1 hora a 4°C. Se eliminó el fijador lavando 3 veces con PBS y eliminando el sobrenadante. Las células fueron incluidas en agarosa (2% [p/v] en PBS) y deshidratadas con etanol (50%/70%/100% progresivamente) durante 15 minutos cada uno. Luego fueron incluidas en resina LRwhite (London Resin Company, London, UK) y polimerizadas toda la noche a 55 °C. Con el ultramicrotomo se realizaron secciones ultrafinas (70 nm) de cada muestra y fueron adheridas a rejillas de níquel (G200-Ni, Electrón Microscopia Sienes, PA, USA). Estas secciones fueron lavadas dos veces en PBS e incubadas con tampón de bloqueo (1% [p/v] BSA) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-CB1 (1:100 en tampón de bloqueo) o anti-CB2 (1:200 en tampón de bloqueo) toda la noche a 4 °C. El control negativo fue realizado remplazando el anticuerpo primario por el tampón de bloqueo. Las secciones fueron lavadas tres veces con PBS (3 X 5 min) e incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con oro coloidal (12 nm) (711-205-152, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:400 en PBS) por 60 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS (3 X 5

min) y una vez secas se contrastaron las rejillas con acetato de uranilo (10 %). Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio electrónico de transmisión (Philips Tecnai 12, Philips, Amsterdeam, The Netherlands).

## **6. Análisis Estadístico y cuantificación de espermatozoides**

De cada muestra analizada, se cuantificaron los patrones de marcaje para el CB1 y CB2 de 200 espermatozoides. El porcentaje de espermatozoides se expresó como la media  $\pm$  ESM (error estándar de la media). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS (SPSS para Windows, V11.0). La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias significativas entre las medias fueron evaluadas usando ANOVA (Análisis de Varianza) y test *post-hoc* de Turkey. Los valores comparados con una  $p < 0,05$  fueron considerados como diferencias significativas.



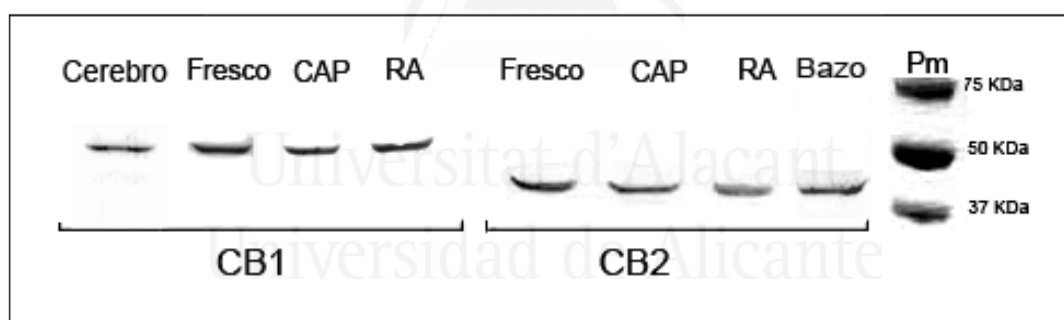
Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Resultados

---

## 1. Detección del CB1 y CB2 por Western blot

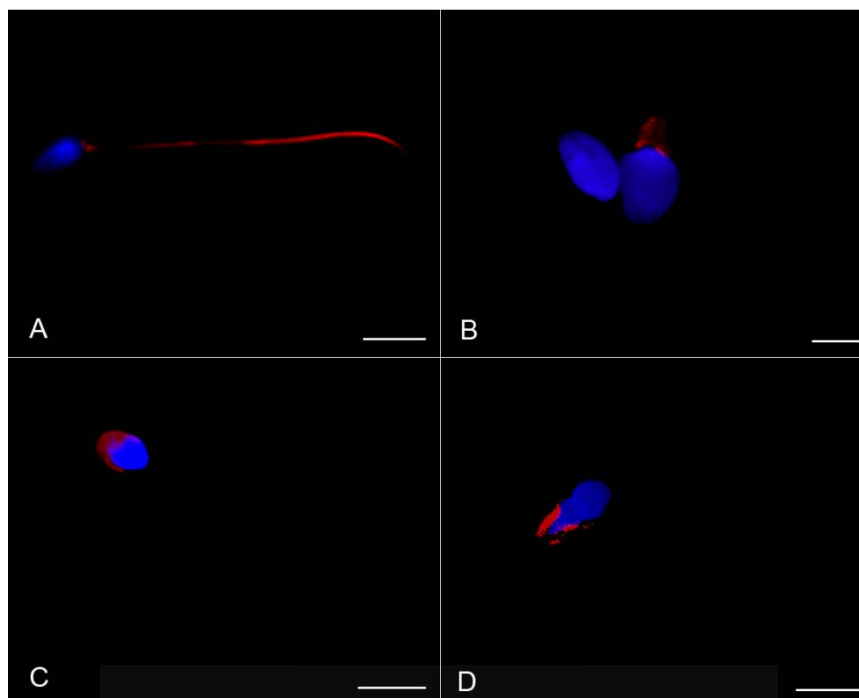
La detección por Western blot de la presencia de los receptores CB1 y CB2 fue realizada en extractos proteicos de espermatozoides humanos frescos, capacitados (CAP) y con reacción acrosómica (RA). En los tres extractos se localizó una banda inmunoreactiva de aproximadamente 55 KDa para el CB1, y de 40 KDa para el CB2. Estos resultados coincidieron con los controles positivos realizados con proteínas del bazo para el CB2, y del cerebro para el CB1 (Fig. 1). Paralelamente se corrió el control negativo, donde la incubación con los anticuerpos primarios fue reemplazada por tampón de bloqueo, en estas calles no se observó ningún tipo de marcaje.



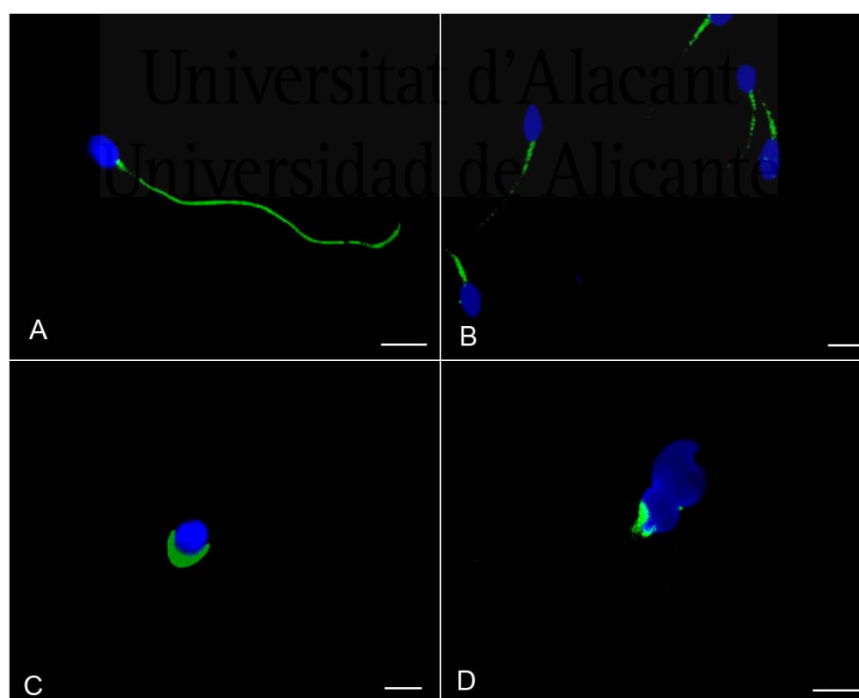
**Figura 1.** Detección por Western blot del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) en espermatozoides humanos frescos, capacitados (CAP) y reaccionados acrosómicamente (RA). Se observó una banda proteica de ~55 KDa para el CB1 y de ~40 KDa para el CB2. Estas bandas fueron confirmadas con los controles positivos realizados en cerebro para el CB1, y en bazo para el CB2. Pm, marcador de peso molecular.

## 2. Inmunolocalización del CB1 y CB2

El CB1 fue detectado mediante fluorescencia en el flagelo (Fig. 2A), pieza intermedia (Fig. 2B), acrosoma (Fig. 2C) y región post-acrosomal (Fig. 2D) de los espermatozoides. De igual forma, se observó inmunomarcaje del CB2 en el flagelo (Fig. 3A), pieza intermedia (Fig. 3B), acrosoma (Fig. 3C) y región post-acrosomal (Fig. 3D) de los espermatozoides.



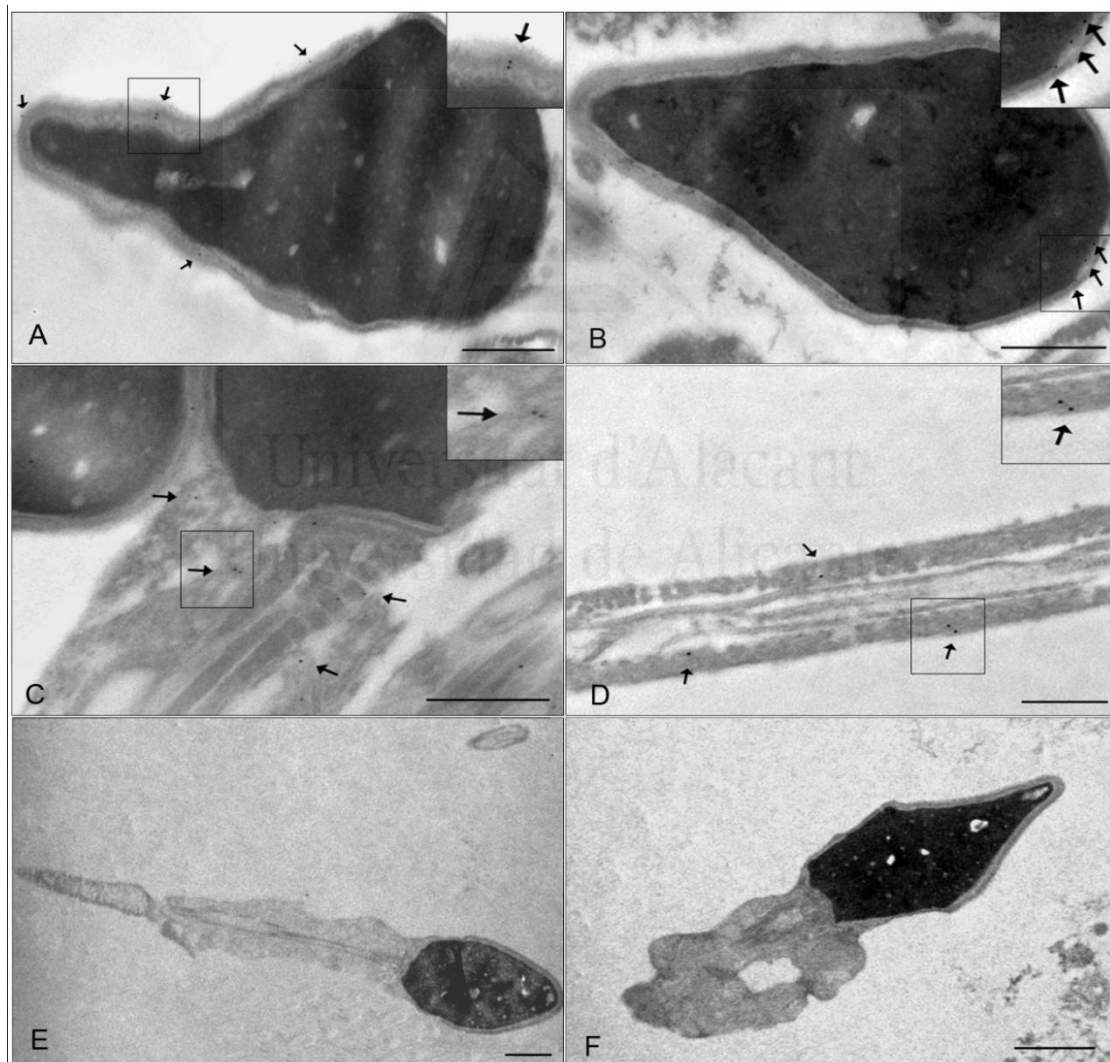
**Figura 2.** Micrografías confocales de espermatozoides humanos con marcaje para receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) (rojo), y contrastados nuclearmente con DAPI (azul). Espermatozoide con inmunoreactividad para el CB1 en el flagelo (A), pieza intermedia (B), acrosoma (C) y post-acrosoma (D). Barra de escala 3  $\mu\text{m}$  (C); 6  $\mu\text{m}$  (A, B, D).



**Figura 3.** Micrografías confocales de espermatozoides humanos con marcaje para receptor de cannabinoide tipo 2 (CB2) (verde), y contrastados nuclearmente con DAPI (azul). Espermatozoide con inmunoreactividad para el CB2 en el flagelo (A), pieza intermedia (B), acrosoma (C) y post-acrosoma (D). Barra de escala 6  $\mu\text{m}$  (A, B); 3  $\mu\text{m}$  (C, D).



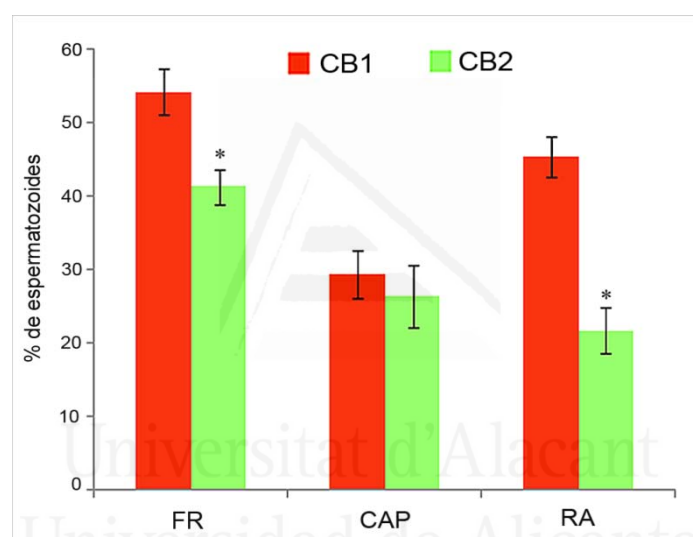
Los patrones inmunofluorescentes encontrados fueron confirmados mediante microscopía electrónica de transmisión. Así, observamos ultraestructuralmente la localización del CB2 en la zona acrosomal (Fig. 4A), post-acrosomal (Fig. 4B), pieza intermedia (Fig. 4C) y flagelo (Fig. 4D) de espermatozoides humanos. En el control negativo, donde se reemplazó el anticuerpo primario por tampón de bloqueo, no se observó ningún tipo de marcaje con las partículas de oro (Fig. E, F). Por otra parte, también se realizó la inmunodetección con partículas de oro para el CB1, y encontramos los mismos patrones de localización ultraestructural para este receptor (datos no se muestran).



**Figura 4.** Localización ultraestructural del receptor de cannabinoide tipo 2 (CB2) en espermatozoides humanos. Micrografías electrónicas que muestran partículas de oro detectando el CB2 en el acrosoma (A), post-acrosoma (B), pieza intermedia (C) y flagelo (D) de células espermáticas. El rectángulo se muestra una mayor magnificación de la figura. Control negativo omitiendo el anticuerpo primario (E, F). Barra de escala 500 nm (A-D), 1  $\mu$ m (E, F).

### 3. Cuantificación de los espermatozoides inmunoreactivos para el CB1 y CB2

Nuestros datos inmunocitoquímicos mostraron que no todos los espermatozoides fueron inmunoreactivos para el CB1 o CB2. Así, en las muestras frescas, solo el  $54,0 \pm 3,0\%$  de los espermatozoides fueron positivos para el CB1 y el  $41,1 \pm 2,2\%$  para el CB2, siendo significativa la diferencia entre ambos ( $p < 0,05$ ). En las muestras capacitadas, no existió diferencia significativa entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el CB1 ( $29,1 \pm 3,3\%$ ) y el CB2 ( $26,2 \pm 4,1\%$ ). Sin embargo, en las muestras con reacción acrosómica, existió una disminución significativa entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el CB1 ( $45,1 \pm 3,3\%$ ) y el CB2 ( $22,6 \pm 3,2\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5).

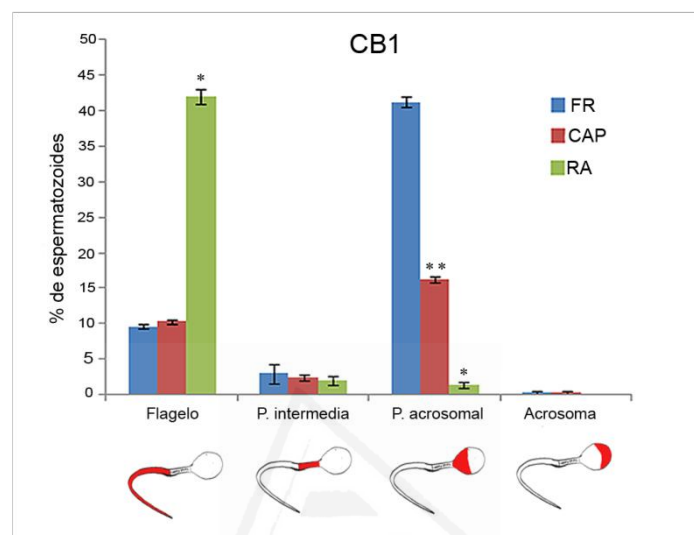


**Figura 5.** Porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB1 y CB2 en muestras frescas (FR), capacitadas (CAP) y con reacción acrosómica (RA). El porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB1 fue significativamente mayor que para el CB2, en muestras frescas y con reacción acrosómica. No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides marcados con el CB1 y el CB2 en las muestras capacitadas. (\*)  $p < 0,05$ .

### 4. Cuantificación de la distribución subcelular del CB1 y CB2

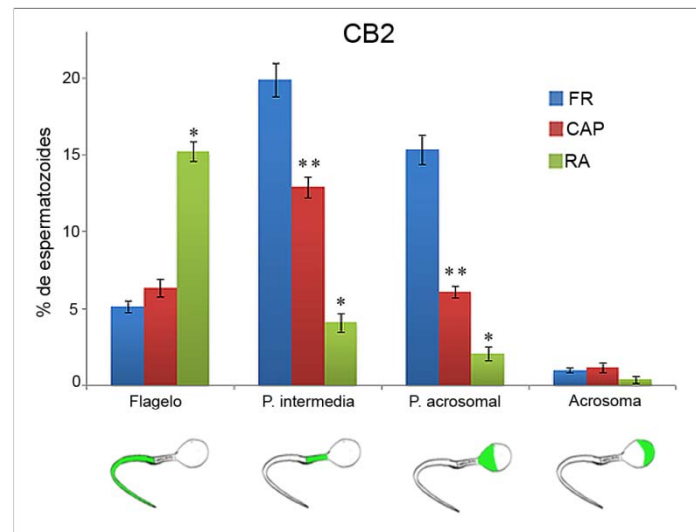
La determinación mediante inmunocitoquímica de los cuatro patrones principales de marcaje, nos permitió clasificar a los espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica según la localización subcelular del CB1 o CB2. El mayor porcentaje de espermatozoides reactivos para el CB1 en el flagelo lo encontramos en las muestras con reacción acrosómica, siendo significativa la diferencia con las muestras frescas y capacitadas ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, existió

una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides reactivos para el CB1 en la región post-acrosomal, en las muestras capacitadas y con reacción acrosómica. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides reactivos para el CB1 en la pieza intermedia y acrosoma, entre muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica (Fig. 6).



**Figura 6.** Porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB1 en las diferentes localizaciones subcelulares de muestras en fresco, capacitadas (CAP) y con reacción acrosómica (RA). Las muestras con reacción acrosómica presentaron el mayor porcentaje de espermatozoides con inmunoreactividad para el CB1 en el flagelo; sin embargo en las muestras en fresco y CAP, este receptor se localizó principalmente en la región post-acrosomal de la cabeza de los espermatozoides. (\*)  $p < 0,05$  vs FR y CAP; (\*\*)  $p < 0,05$  vs FR y RA.

El mayor porcentaje de espermatozoides reactivos para el CB2 en el flagelo lo encontramos en las muestras con reacción acrosómica, siendo significativa esta diferencia con muestras frescas y capacitadas ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, existió una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB2 en la pieza intermedia de las muestras capacitadas y con reacción acrosómica; y esta disminución del porcentaje también se pudo apreciar en la región post-acrosomal. El porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB2 en el acrosoma fue muy bajo (0,4-1,2%) y no existieron diferencias significativas entre muestras frescas, capacitadas y con reacción acrosómica (Fig. 7).



**Figura 7.** Porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB2 en las diferentes localizaciones subcelulares de muestras frescas (FR), capacitadas (CAP) y con reacción acrosómica (RA). Cuando realizamos la comparación con la muestra en fresco, observamos en muestras con reacción acrosómica un aumento en el porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB2 en el flagelo y una disminución de ese porcentaje en la pieza intermedia y región post-acrosomal. En muestras capacitadas, existió una disminución del porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para el CB2 en la pieza intermedia y región post-acrosomal. (\*)  $p < 0,05$  vs FR y CAP; (\*\*)  $p < 0,05$  vs FR y RA.

## Discusión

---

Nuestros datos del Western blot revelaron la presencia del CB1 y CB2 en los espermatozoides humanos frescos, capacitados y con reacción acrosómica. En relación al CB1, fue detectada una banda proteica de aproximadamente 55 KDa, la cual coincide con el control positivo y con otros trabajos previos en espermatozoides [150, 159]. Por otra parte, también se detectó una banda inmunoreactiva para el CB2 con un peso molecular aproximado de 40 KDa, la misma que aparece en el control positivo y en estudios realizados previamente [151, 160]. Ambos receptores tienen una localización muy bien definida en las células del organismo. Así, el CB2 se encuentra principalmente en las células del sistema inmune, mientras que el CB1 en las del sistema nervioso central [139, 145]. Sin embargo, en el espermatozoide se expresan ambos tipos de receptores, lo que sugiere que los endocannabinoides tienen la capacidad de regular una gran diversidad de mecanismos moleculares en las células espermáticas.

La fracción de espermatozoides frescos y con reacción acrosómica inmunoreactivos para el CB1 fue significativamente mayor que para el CB2. Este hecho no es exclusivo de las células espermáticas, ya que también durante la maduración del ovocito se producen cambios en la expresión de ambos tipos de receptores [161]. El sistema de endocannabinoides, a través de sus receptores, tiene la capacidad de regular muchas funciones en el sistema reproductor masculino. Por ejemplo, se ha demostrado que el CB2 en las células de Sertoli regula su apoptosis, y el CB1 induce la producción de testosterona [162, 163]. Además, la activación de los receptores de cannabinoides produce una inhibición de la capacitación, reacción acrosómica y fertilización en espermatozoides de muchas especies [150, 152, 159]. La expresión diferencial del CB1 y CB2 en los diferentes estados fisiológicos de las células espermáticas sugiere que el sistema de endocannabinoides está íntimamente relacionado con la capacidad fecundante del espermatozoide.

Mediante la inmunocitoquímica hemos demostrado que los receptores de cannabinoides fueron localizados en el acrosoma, región post-acrosomal, pieza intermedia y flagelo de espermatozoides humanos. Además, en espermatozoides frescos y capacitados la localización del CB1 fue principalmente en la región post-acrosomal; y del CB2 en la pieza intermedia. Sin embargo, en espermatozoides reaccionados acrosómicamente el CB1 y CB2 se expresó principalmente en el flagelo. Nuestros datos coinciden con otros autores, que encontraron diferentes patrones de distribución subcelular del CB1 y CB2 en espermatozoides frescos [150, 151, 159]. Además, esta localización heterogénea es un hecho que ya ha sido descrito en un gran número de receptores espermáticos [164, 165]. Por otra parte, se ha demostrado que los endocannabinoides producen una inhibición de la capacitación y reacción acrosómica [155, 159]. La capacitación es un término muy ambiguo utilizado en reproducción para definir al conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos que experimenta el espermatozoide en su paso por tracto genital femenino [166]. Estos cambios incluyen la reorganización de la membrana plasmática, fosforilación de proteínas e incremento de la concentración del ión calcio [34, 167, 168]. En este sentido, el aumento del calcio intracelular es una condición fundamental para que se produzca la reacción acrosómica [169-171]. En células somáticas la elevación del calcio intracelular proviene tanto de la liberación de depósitos internos, como del ingreso del exterior [172]. Sin embargo, en espermatozoides los depósitos de calcio intracelulares son poco conocidos, y se cree que la elevación del calcio proviene principalmente del ingreso del exterior a través de canales de calcio [173]. Estos canales de calcio son muy diversos y presentan diferentes localizaciones subcelulares [40]. Por ejemplo, los canales de calcio pertenecientes a la familia "Catsper" presentan 4 tipos diferentes; el Catsper1 se localiza en el flagelo, el Catsper2 en el flagelo y pieza intermedia y el Catsper 3 y 4 en la cabeza de los espermatozoides [40, 173]. Por otra parte, la activación de los receptores de cannabinoides inhiben los canales de calcio vía segundos mensajeros [138, 156]. Así, la localización heterogénea de los receptores de cannabinoides podría deberse a la regulación de diferentes tipos de canales de calcio, y mediante este mecanismo molecular, influir en la capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides. No obstante, la regulación del sistema de

endocannabinoides en los mecanismos moleculares del espermatozoide es aún poco conocida, y esta hipótesis deberá ser confirmada mediante estudios posteriores.

En conclusión, hemos demostrado que los espermatozoides expresan el CB1 y el CB2 y que su localización subcelular se modifica a medida que el espermatozoide pasa a través de los diferentes estados funcionales previo a la interacción con el ovocito. Estos cambios en la distribución podrían indicar la regulación del sistema de endocannabinoides en los diferentes tipos de canales de calcio, aunque estudios posteriores deberán confirmar esta hipótesis.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Efecto de los endocannabinoides, 2-  
araquidonilglicerol y 2-araquidonilglicerol  
éter, en las funciones *in vitro* del  
espermatozoide humano**

---



## Resumen

---

El 2-araquidonilglicerol (2AG) y el 2-araquidonilglicerol éter (2AGE) son compuestos sintetizados por los tejidos de mamíferos, y en conjunto son llamados “endocannabinoides”. Los endocannabinoides regulan entre otros, el sistema reproductor masculino, afectando a las funciones de las células espermáticas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la acción del 2AG y 2AGE en espermatozoides humanos. Así el principal objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del 2AG y 2AGE, en las funciones *in vitro* de espermatozoides humanos frescos y capacitados. Nuestros datos mostraron que el 2AG y 2AGE producen una disminución de la motilidad espermática y una inducción de la reacción acrosómica. Además, el 2AG afecta al proceso de capacitación por *swim-up* produciendo una disminución en la fosforilación de proteínas. Estos resultados sugieren que los cannabinoides tienen un importante papel en la regulación de las funciones espermáticas requeridas para la fecundación del ovocito.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Introducción

---

La marihuana es la droga recreacional más usada a nivel mundial, la consumen entre 129-191 millones de personas de 15 a 64 años [174-176]. España es uno de los primeros cinco países de la Unión Europea con una mayor prevalencia anual de consumo en jóvenes de edad escolar [177]. Así, uno de cada cinco jóvenes españoles (14-18 años) consume marihuana habitualmente [177]. Además, el principio activo de la marihuana, también es usado para tratar diferentes enfermedades como la esclerosis múltiple [178-181], el Alzheimer [182-184] o para evitar los efectos secundarios de la quimioterapia contra el cáncer [185, 186]. Así, hay muchos pacientes expuestos a los principios activos de la marihuana, sin que decidiesen consumirla de forma recreativa. Por ejemplo, entre el 10-15 % de los pacientes con esclerosis múltiple son tratados con derivados farmacológicos del cannabis [187]. Por esta razón, es muy importante conocer en profundidad los efectos que produce la marihuana en los sistemas biológicos.

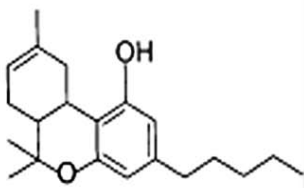
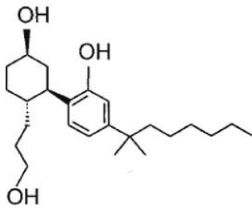
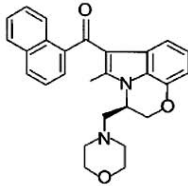
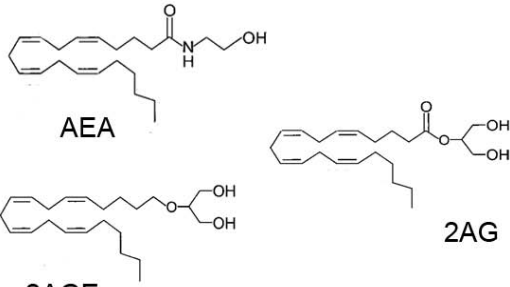
Los cannabinoides son compuestos pertenecientes a los terpenofenoles. Originalmente su nombre aludía al grupo de sustancias responsables de los efectos farmacológicos característicos de la planta de la marihuana ("*cannabis sativa*"). Los cannabinoides pueden ser clasificados en cuatro grupos según su estructura química [138]. El primer grupo son los "cannabinoides clásicos", donde está incluido el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), principal compuesto psicotrópico de la marihuana (Fig. 1A) [188]. El segundo grupo llamados "cannabinoides no clásicos", se diferencian de los anteriores por carecer del anillo de pirano (Fig. 1B). El tercer grupo son los derivados del aminoalquil-indol, y de este grupo podemos destacar el Win 55,212-2 (Fig. 1C) [189]. Y por último el grupo de los "eicosanoides" que contienen derivados del ácido araquidónico, e incluyen a la *N*-araquidonil-etanolamina o anandamida (AEA), el ácido 2-araquidonilglicerol (2AG) y el ácido 2-araquidonilglicerol éter (2AGE) (Fig. 1D)[190].

La AEA, el 2AG y el 2AGE son sintetizados por los tejidos de mamíferos, y en conjunto son llamados "endocannabinoides". La AEA fue inicialmente descubierta

en el cerebro de mamíferos [190], pero hoy en día sabemos que también está presente en los fluidos reproductivos como el plasma seminal, fluidos foliculares, líquido amniótico y leche [191]. Además, en estos fluidos también existen otros potentes endocannabinoides como el 2-AG y el 2-AGE [139, 192](Fig. 1D). Tanto los cannabinoides como los endocannabinoides producen sus efectos uniéndose a dos tipos de receptores: el receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2). En la naturaleza la distribución del CB1 y CB2 es muy diversa: mamíferos, peces, invertebrados, microorganismos y plantas superiores [142-144, 193]. El CB1 está ampliamente distribuido en diferentes tejidos, en cambio, el CB2 se encuentra principalmente en el sistema inmune [139]. Sin embargo, el espermatozoide expresa ambos tipos de receptores [150, 151]. Los receptores de cannabinoides junto con las enzimas responsables de sintetizar y metabolizar los cannabinoides constituyen el “sistema de endocannabinoides” [194]. Este sistema está implicado en la regulación de muchas funciones en el sistema nervioso [195], inmune [196], cardiovascular [197], gastrointestinal [198] y reproductor [199-203]. En mujeres, la concentración de AEA está directamente relacionada con la tasa de implantación [204]. Además, este endocannabinoide es sintetizado por el ovario y es capaz de regular la foliculogénesis, maduración del folículo preovulatorio y ovulación [201]. En el sistema reproductivo masculino, los cannabinoides tienen influencia en la espermatogénesis disminuyendo los niveles de LH y testosterona [205, 206], y afectan a las funciones espermáticas. Por ejemplo, la AEA provoca la disminución de la motilidad espermática y está relacionada con su adquisición en el epidídimo [150, 154].

Los espermatozoides de humanos y de otros mamíferos no son capaces de fertilizar al ovocito una vez eyaculados. Esta capacidad la adquieren *in vivo* al atravesar el tracto genital femenino en un proceso llamado capacitación [5-7, 207]. La capacitación incluye modificaciones intracelulares, incremento de la fluidez de la membrana y fosforilación de proteínas [34, 169]. Pero una vez que el espermatozoide se encuentra con el ovocito, necesita atravesar la zona pelúcida a través de la exocitosis de enzimas hidrolíticas localizadas en la parte anterior de su cabeza, en un evento llamado reacción acrosómica [208, 209]. Los endocannabinoides están íntimamente relacionados con la capacitación y reacción

acrosómica [155]. Por ejemplo, se ha demostrado que la AEA inhibe estos eventos en células espermáticas [150, 159, 193]. Sin embargo, existen muy pocos estudios donde se evalúe la acción del 2-AG y 2-AGE en las funciones *in vitro* de espermatozoides humanos. Así, los principales objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 2-AG y 2-AGE en la motilidad, viabilidad, reacción acrosómica de espermatozoides humanos frescos. 2) Determinar el efecto del 2-AG en espermatozoides capacitados y en el proceso de capacitación (*swim-up*) evaluando la motilidad, reacción acrosómica y fosforilación de proteínas.

1º Grupo: "Cannabinoides Clásicos"	2º Grupo: "Cannabinoides No Clásicos"
 <p style="text-align: center;">THC</p> <p>A</p>	 <p style="text-align: center;">CP 55,940</p> <p>B</p>
3º Grupo: "Derivados del Aminoalquil-indol"	4º Grupo: "Eicosanoides"
 <p style="text-align: center;">WIN 55,212-2</p> <p>C</p>	 <p style="text-align: center;">AEA</p> <p style="text-align: center;">2AGE</p> <p style="text-align: center;">2AG</p> <p>D</p>

**Figura 1:** Principales grupos de cannabinoides. **(A)** 1º Grupo, "cannabinoides clásicos",  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC). **(B)** 2º Grupo, "cannabinoides no clásicos", un componente de este grupo es el CP 55, 940. **(C)** 3º Grupo, "derivados del aminoalquil-indol", el Win 55,212-2 pertenece a este grupo. **(D)** 4º Grupo, "eicosanoides", que incluyen *N*-araquidonoil-etanolamina anandamida (AEA), el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG).

# Material y Métodos

---

## 1. Muestras seminales

Las muestras seminales fueron obtenidas del banco de semen del Instituto Bernabeu (Alicante) a partir de donantes sanos (18-35 años de edad; n=15) luego de 3-4 días de abstinencia sexual. Los voluntarios accedieron al uso de sus muestras para fines científicos firmando un consentimiento informado, de acuerdo con los estándares éticos requeridos para tal fin.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos para que se produzca la licuefacción. Luego se realizó un seminograma completo de cada muestra, donde se evaluaron los parámetros: volumen, concentración, licuefacción, pH, motilidad, viabilidad y morfología; clasificándolas como normozoopérmicas de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2].

## 2. Ensayo de los endocannabinoides 2-AG y 2-AGE en espermatozoides frescos

De cada muestra en fresco fue eliminado el plasma seminal mediante 2 lavados con PBS (buffer fosfato salino 1X, pH: 7,4) (Gibco, Invitrogen, CA, USA). Se dividió cada muestra en 11 alícuotas y cada de una de estas fue incubada con una concentración de 2-AG (62160, Cayman Chemical Company, MI, USA) o 2-AGE (62165, Cayman chemical company, MI, USA): 10nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM, durante 2 horas a 37°C. También se realizó un control, donde el endocannabinoide se sustituyó por PBS. De cada alícuota se tomó 5 μL y se evaluó la motilidad espermática en un microscopio de contraste de fases (Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Se clasificó a los espermatozoides de acuerdo a su motilidad en: móviles progresivos, móviles no progresivos o no móviles, según las recomendaciones de la OMS 2010 [2]. La viabilidad espermática se realizó mediante la técnica de eosina-nigrosina (ver apartado 5). Por otra parte,

se fijó cada alícuota en cubreobjetos de 8mm de diámetro con metanol a (-20 °C) durante 15 minutos, para posteriormente realizar la evaluación de la reacción acrosómica mediante la técnica de FITC-PSA (ver apartado 6).

### **3. Ensayo del endocannabinoide 2-AG en el proceso de *swim-up***

Cada una de las muestras fue dividida en 4 alícuotas en tubos Falcon, a cada una de ellas se le agregó 0,5 ml de medio de cultivo HAM F-10 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) suplementado (0,6 %[p/v] de albúmina sérica humana; 0,2 %[p/v] de bicarbonato de sodio; 0,36 % [v/v] de lactato de sodio y  $3 \cdot 10^{-3}$  % [p/v] de piruvato de sodio) a 37 °C y se centrifugó a 250 g durante 10 minutos para eliminar el plasma seminal. Luego de eliminar el sobrenadante, cada alícuota fue incubada durante 2 horas a 37 °C con 0,5 ml de HAM F-10 y añadiendo 2AG para obtener diferentes concentraciones: 1 µM, 10 µM y 100 µM. También se realizó un control, donde el 2-AG se sustituyó por medio de cultivo. Luego del tiempo de incubación, se evaluó la viabilidad (eosina/nigrosina) y se fijó la muestra en metanol como se ha mencionado anteriormente. Con estos espermatozoides se realizó la determinación de la reacción acrosómica (ver apartado 6) y de la fosforilación de proteínas tirosina (ver apartado 7).

### **4. Ensayo del endocannabinoide 2-AG en espermatozoides capacitados**

Los espermatozoides fueron capacitados mediante la técnica de *swim-up*. Para ello, la muestra fue lavada con medio de cultivo HAM F-10 suplementado a 37 °C y centrifugada a 250 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de medio de cultivo fresco. Se incubó durante 1 hora 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> manteniendo el tubo Falcon en una posición de 45°. Luego se recolectó el sobrenadante con los espermatozoides capacitados y se dividió en 4 alícuotas. A cada una de ellas se las incubó 2 horas a 37 °C con diferentes concentraciones de 2-AG: 1 µM, 10 µM y 100 µM. También se realizó un control, donde el 2-AG se sustituyó por medio de cultivo. Tras la incubación, se evaluó la viabilidad (eosina/nigrosina) (ver apartado 5) y los espermatozoides se fijaron con metanol

como se ha mencionado anteriormente. Con estos espermatozoides se realizó la determinación de la reacción acrosómica (ver apartado 6) y de la fosforilación de proteínas (ver apartado 7).

### **5. Estudio de la viabilidad espermática mediante la técnica de eosina-nigrosina**

La técnica de eosina-nigrosina se realizó mezclando en un portaobjetos 10  $\mu\text{L}$  de la muestra con 10  $\mu\text{L}$  de una solución de eosina Y (0,5 %) [p/v] (CI 45380, Panreac química SAU, Barcelona, ES) en solución acuosa de cloruro sódico 0,9 % [p/v]. Se incubó 1 minuto y se añadió 10  $\mu\text{L}$  de nigrosina (10 % [v/v]), que actuó como contraste. Se realizó una extensión en el portaobjetos y se dejó secar. Así, aquellos espermatozoides muertos, permitieron que la eosina penetrase y se observaron de color rosa. En cambio, aquellos espermatozoides vivos, mantuvieron sus membranas plasmáticas intactas visualizándose de color blanco. La muestra fue evaluada en un microscopio óptico a 40 X y se contabilizaron 200 espermatozoides.

### **6. Estudio de la evaluación de la reacción acrosómica mediante la técnica de FITC-PSA**

Con los espermatozoides fijados en metanol, se evaluó el porcentaje de espermatozoides que sufrieron reacción acrosómica mediante la técnica FITC-PSA (lectina "*Pisum sativum*" aglutinina marcada con isotiocianato de fluoresceína). El fundamento de esta técnica es que la lectina PSA tiene afinidad por los residuos de manosa y galactosa, específicamente localizados en el dominio acrosomal. Es decir, que los espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica presentaron una fluorescencia negativa. Al contrario, los espermatozoides con fluorescencia positiva fueron aquellos con su acrosoma intacto.

Para realizar esta técnica, se incubó los espermatozoides con FITC-PSA (L0770, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA, dilución 1:20 en PBS) durante

30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con PBS (3 X 5 min), y a cada muestra se añadió 5 µl de medio de montaje para fluorescencia Vecta Shield (Vector laboratories LTD, UK). Se evaluó la reacción acrosómica en 200 espermatozoides mediante un microscopio de epifluorescencia LEICA y confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

## **7. Estudio de la fosforilación de proteínas a través de inmunofluorescencia indirecta**

Los espermatozoides fijados anteriormente con metanol fueron lavados dos veces con PBS durante 5 minutos. Se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas mediante un tampón (1% [p/v] BSA, 10% [v/v] suero fetal bovino) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo primario monoclonal anti- $\alpha$ -fosfotirosina (P4110, Sigma-Adrich, SL, USA) (1:500 en tampón de bloqueo), a 4 °C durante toda la noche. Paralelamente se realizó un control negativo reemplazando el anticuerpo primario por solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con PBS e incubó con el anticuerpo secundario, anti-mouse DyL 488 (711-205-152, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:500 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS y se añadió a las muestras 5 µl de medio de montaje para fluorescencia Vecta Shield (Vector laboratories LTD., UK) con DAPI (1% [v/v]) (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloridem; Sigma-Adrich, SL, USA), para visualizar los núcleos espermáticos. Las muestras fueron evaluadas utilizando un microscopio de epifluorescencia y confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

## **8. Procesamiento de imágenes**

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). El marcaje con DyLight 488 y FICT fue excitado usando el láser de Ar a 488 nm, y para la detección del DAPI fue utilizado el láser unido al diodo de 405 nm. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el



programa Leica TCS SP2-PC. El ajuste del brillo y contraste fue realizado con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

## 9. Análisis Estadístico

Los valores son presentados como la media  $\pm$  ESM (error estándar de la media). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 11.0. La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias significativas entre las medias fueron evaluadas usando ANOVA (Análisis de Varianza) y test *post-hoc* de Turkey. Los valores comparados con una  $p < 0,05$  son considerados como diferencias significativas.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

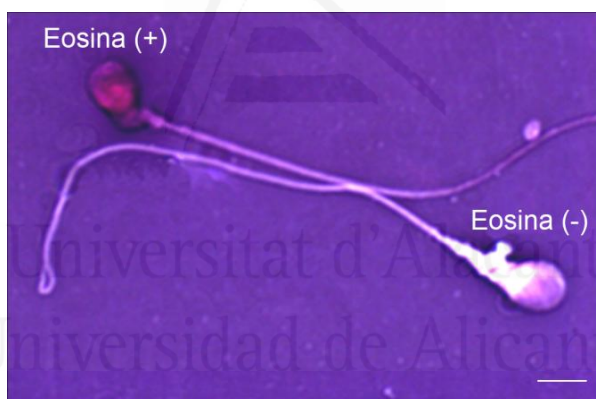
# Resultados

---

## 1. Efecto del 2AG y 2AGE en la viabilidad, reacción acrosómica y motilidad de espermatozoides humanos frescos

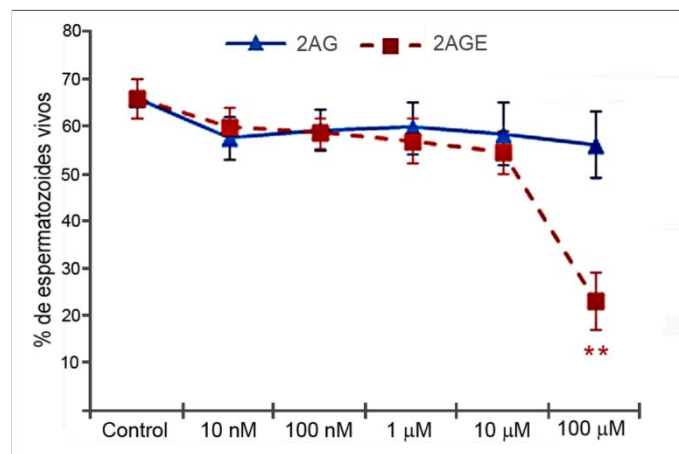
### 1.1. Viabilidad

El efecto del 2AG y 2AGE en la viabilidad de los espermatozoides, fue evaluado mediante la técnica de tinción eosina-nigrosina. Así, los espermatozoides vivos con su membrana plasmática intacta, no permitieron que la eosina penetre y fueron observados de color blanco. Al contrario, aquellos espermatozoides muertos se observaron de color rosa, al haber penetrado la eosina (Fig. 2).



**Figura 2.** Micrografía realizada con un microscopio óptico de campo claro donde se observan espermatozoides humanos teñidos con eosina-nigrosina. En los espermatozoides vivos, la eosina no pudo penetrar y se observaron de color blanco (eosina [-]); al contrario, los de color rosa son los muertos con su membrana plasmática dañada (eosina [+]). Barra de escala 5  $\mu$ m.

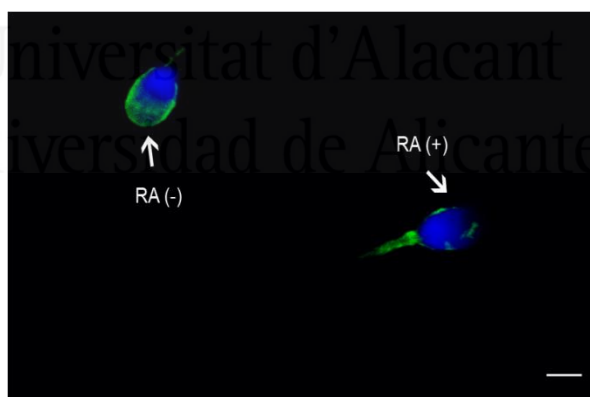
El 2AG no afectó a la viabilidad de los espermatozoides humanos, ya que no existieron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos, entre las cinco concentraciones evaluadas y el control. Sin embargo, el 2AGE-100 $\mu$ M provocó una disminución significativa en la viabilidad de las células espermáticas ( $23,2 \pm 6,2\%$ ) en comparación a la alícuota control ( $65,9 \pm 4,0\%$ ). En las concentraciones menores que 100  $\mu$ M, el 2AGE no tuvo ningún efecto en la viabilidad espermática (Fig. 3).



**Figura 3.** Efecto del 2AG y 2AGE en la viabilidad de espermatozoides humanos frescos. La única disminución significativa de la viabilidad espermática fue provocada por el 2AGE-100  $\mu$ M, con respecto al control. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM (error estándar de la media). (\*\*)  $p < 0,01$  vs el control.

## 1.2. Reacción acrosómica

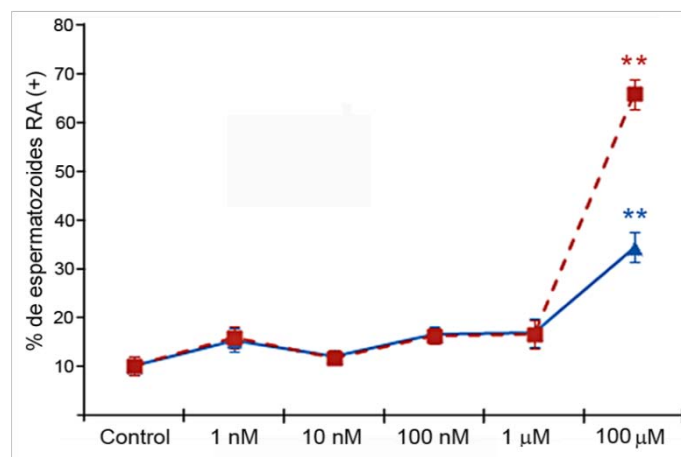
La reacción acrosómica de los espermatozoides fue evaluada mediante la técnica FITC-PSA. Así, a los espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica se los observó de color verde (RA -); al contrario, no tuvieron marcaje aquellos sin el acrosoma (RA +) (Fig. 4).



**Figura 4.** Micrografía confocal de espermatozoides humanos marcados con FITC-PSA (verde) y nuclearmente contrastados con DAPI (azul). Se observan espermatozoides que han perdido el contenido acrosomal (RA +) y con el acrosoma intacto (RA -). Barra de escala 5  $\mu$ m.

El tratamiento de las muestras con concentraciones progresivas de 2AG y 2AGE provocó un aumento en el porcentaje de espermatozoides RA (+). Así el porcentaje de espermatozoides RA (+) aumentó significativamente en las alícuotas tratadas con 2AG-100 $\mu$ M ( $34,5 \pm 3,0\%$ ) y 2AGE-100 $\mu$ M ( $65,9 \pm 2,4 \%$ ) con respecto al control ( $10,0 \pm 1,9\%$ ). Sin embargo, en las concentraciones inferiores a 100  $\mu$ M,

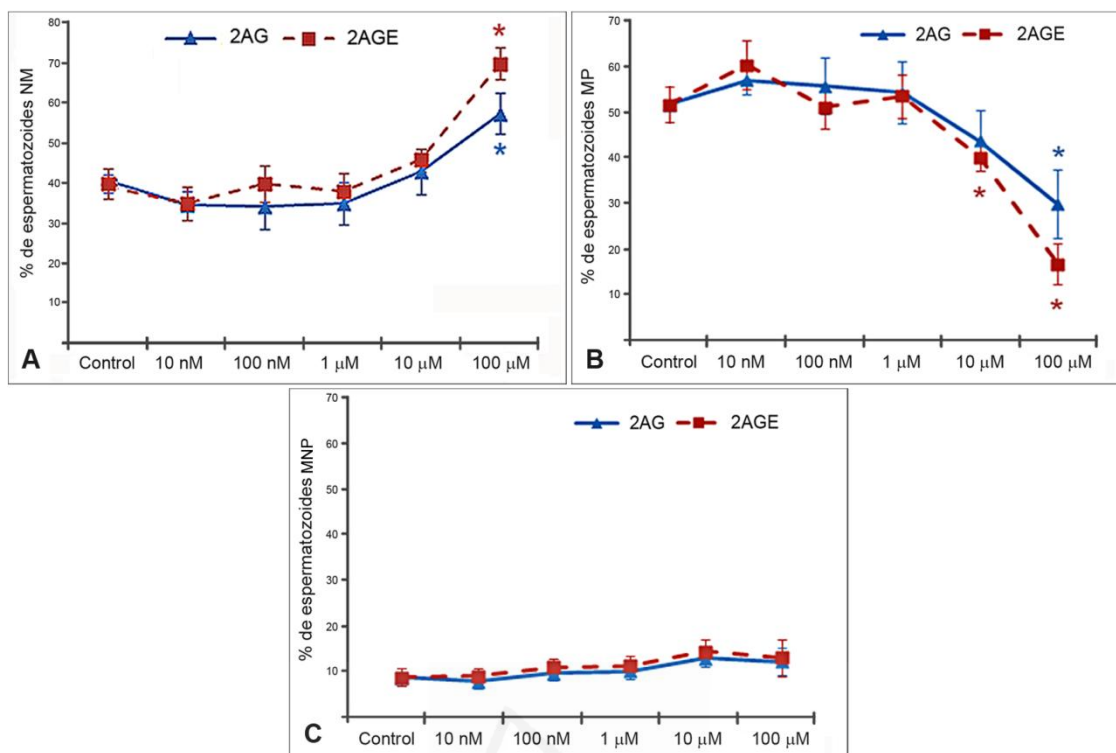
ambos endocannabinoides no tuvieron ningún efecto sobre la exocitosis acrosomal (Fig. 5).



**Figura 5.** Efecto del 2AG y 2AGE en la reacción acrosómica de espermatozoides frescos. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides reaccionados acrosómicamente cuando la muestra fue incubada con el 2AG y 2AGE a 100  $\mu$ M. No existieron diferencias significativas entre el control y las concentraciones inferiores a 100  $\mu$ M de ambos endocannabinoides. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. (\*\*)  $p < 0,01$  vs control.

### 1.3. Motilidad

El efecto del 2AG y 2AGE sobre la motilidad fue evaluada clasificando a los espermatozoides según los criterios de la OMS [210] en móviles progresivos (MP), móviles no progresivos (MNP) y no móviles (NM). El porcentaje de espermatozoides NM fue significativamente mayor cuando la muestra fue incubada con 2AG-100 $\mu$ M ( $57,4 \pm 5,00\%$ ) y 2AGE-100 $\mu$ M ( $69,8 \pm 4,1\%$ ) en relación al control ( $40,6 \pm 3,9\%$ ) (Fig. 6A). Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides MP fue significativamente menor en el 2AG-100 $\mu$ M ( $29,8 \pm 7,6\%$ ), 2AGE-10 $\mu$ M ( $40,0 \pm 2,9\%$ ) y 2AGE-100 $\mu$ M ( $16,6 \pm 4,5\%$ ) en relación al control ( $51,5 \pm 4,6\%$ ) (Fig. 6B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides MNP entre el control y las concentraciones de 2AG y 2AGE evaluadas (Fig. 6C).



**Figura 6.** Efecto del 2AG y 2AGE en la motilidad de espermatozoides humanos frescos. **(A)** El 2AG y 2AGE (100 μM) provocaron un aumento significativo en porcentaje de espermatozoides no móviles (NM). **(B)** El porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (MP) fue significativamente menor en 2AG-100μM, 2AG-10μM y 2AGE-100μM. **(C)** No existieron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (MNP) en las concentraciones evaluadas. Los datos se muestran como la media ± ESM. (\*)  $p < 0,05$  vs control.

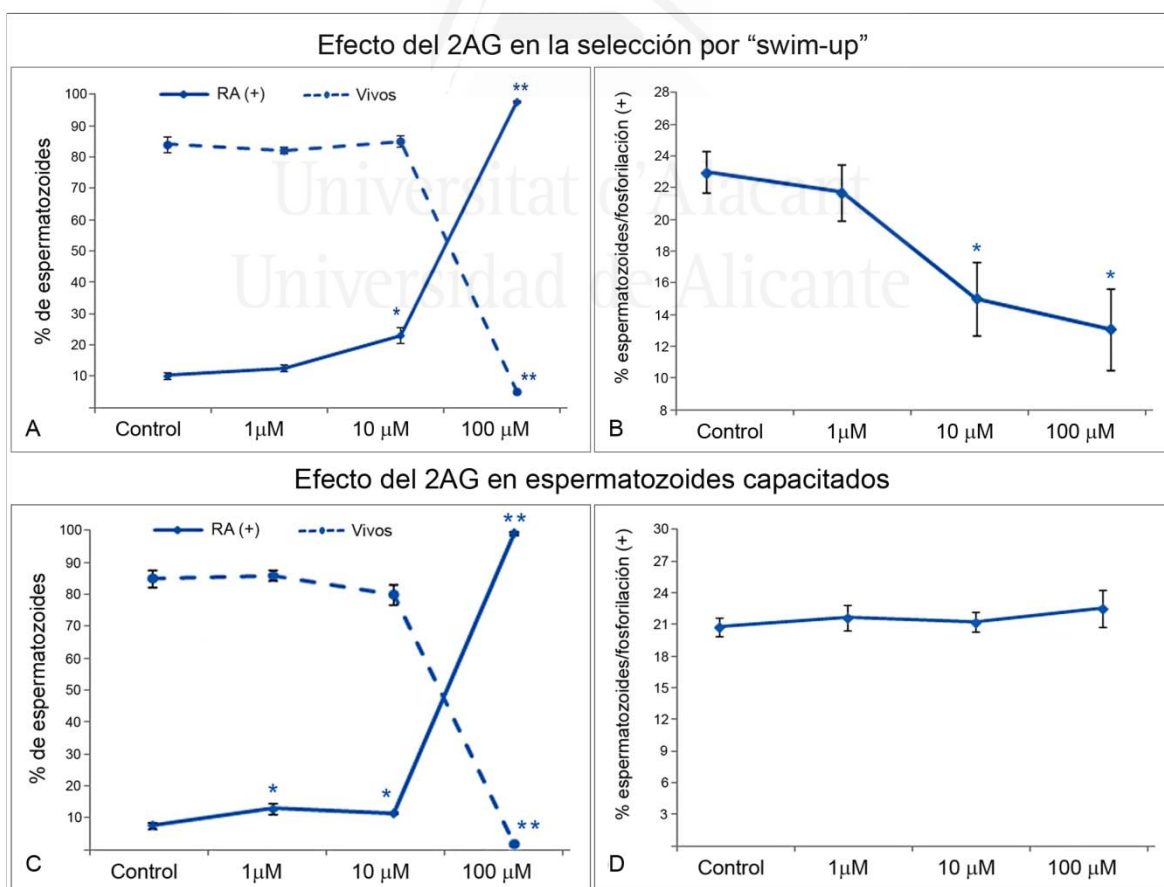
## 2. Efecto del 2AG en el proceso de selección por *swim-up* y en espermatozoides capacitados

El efecto del 2AG en la selección por *swim-up*, se realizó incubando los espermatozoides con medio de cultivo (HAM F-10, suplementado) y concentraciones crecientes de este endocannabinoide. También fue evaluado el efecto de este endocannabinoide en los espermatozoides una vez capacitados.

La incubación con 2AG en el *swim-up* afectó a la viabilidad, provocando una disminución significativa cuando se los incubó con la concentración más alta (100 μM) ( $2,0 \pm 0,6\%$ ) en relación a la alícuota control ( $85,0 \pm 2,7\%$ ) (Fig. 7A). Por otra parte, la reacción acrosómica fue significativamente mayor con el 2AG-10μM ( $21,02 \pm 2,61\%$ ) y el 2AG-100μM ( $99,29 \pm 0,52\%$ ) en relación al control ( $7,51 \pm 1,20\%$ ) (Fig. 7A). La eficacia en la capacitación de los espermatozoides fue

evaluada mediante el porcentaje de espermatozoides que realizaron la fosforilación de los residuos tirosina de sus proteínas [11, 211]. Así, el porcentaje de espermatozoides con fosforilación de proteínas disminuyó significativamente cuando se realizó el *swim-up* con 2AG-10 $\mu$ M ( $14,8 \pm 1,8\%$ ) y 2AG-100 $\mu$ M ( $13,3 \pm 2,0\%$ ) en relación al control ( $21,0 \pm 1,1\%$ ) (Fig. 7B).

En los espermatozoides capacitados, el 2AG afectó a la viabilidad provocando una disminución significativa cuando se lo incubó con la concentración 100  $\mu$ M ( $0,6 \pm 0,1\%$ ) en relación al control ( $88,9 \pm 1,9\%$ ) (Fig. 7C). Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica aumentó significativamente en el 2AG 1 $\mu$ M ( $13,1 \pm 1,8\%$ ), 10  $\mu$ M ( $12,1 \pm 0,5\%$ ) y 100  $\mu$ M ( $99,2 \pm 0,4\%$ ) en relación al control ( $7,2 \pm 1,1\%$ ) (Fig. 7C). Sin embargo, en la fosforilación de proteínas no se observaron diferencias significativas entre el control y los espermatozoides incubados con las diferentes concentraciones de 2AG (Fig. 7D).



**Figura 7.** Efecto del 2AG en el proceso de selección por *swim-up* y en espermatozoides capacitados. **(A)** En la selección por *swim-up* el 2AG-100  $\mu$ M causó una disminución significativa de la viabilidad espermática; y la

reacción acrosómica fue inducida por el 2AG-10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . **(B)** En la selección por *swim-up*, el porcentaje de espermatozoides con fosforilación de proteínas fue significativamente menor cuando se los incubó con 2AG 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . **(C)** En espermatozoides capacitados, el 2AG-100  $\mu\text{M}$  causó una disminución significativa de la viabilidad; y la reacción acrosómica fue inducida por el 2AG 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . **(D)** En espermatozoides capacitados, no existieron diferencias significativas en la fosforilación de proteínas. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  vs control.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## Discusión

---

En este estudio hemos analizado el efecto de los endocannabinoides 2AG y 2AGE en las funciones espermáticas, incluyendo la motilidad, capacitación y reacción acrosómica.

En relación a la motilidad, nuestros resultados muestran que 2AG y 2AGE provocan una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles progresivos. La disminución de la motilidad con el 2AGE-100 $\mu$ M podría estar relacionada con la menor viabilidad observada en esta concentración. Sin embargo, el 2AG-100 $\mu$ M y 2AGE-10 $\mu$ M también causaron una disminución de la motilidad progresiva sin afectar a la viabilidad. Este efecto sobre la motilidad de espermatozoides también se ha observado con otros endocannabinoides como la AEA [150, 159], así como con el principal componente activo de la marihuana el THC [158, 212]. Además, se ha demostrado que los cannabinoides inhiben la actividad mitocondrial tanto en espermatozoides [150] como en otras células del organismo [213]. En este sentido, la motilidad espermática está estrechamente relacionada con la actividad mitocondrial [214], ya que a través de la generación de ATP proporciona la energía necesaria para el movimiento [215]. Estos datos sugieren que el 2AG y el 2AGE afectan a la motilidad espermática como resultado de un declive en la actividad mitocondrial.

La capacitación se define como los cambios estructurales y funcionales que ocurren en el espermatozoide cuando atraviesa el tracto genital femenino [5, 6]. Estos cambios incluyen la reorganización de la membrana plasmática, regulación de la permeabilidad a diferentes iones, pérdida de colesterol y fosforilación de proteínas [11, 216]. En el presente trabajo, hemos realizado la capacitación *in vitro* a través de la técnica del *swim-up* y evaluamos su eficacia a través de la fosforilación de proteínas. Así, observamos que el porcentaje de espermatozoides con fosforilación de proteínas disminuye significativamente en presencia del 2AG-10 y 100 $\mu$ M. Sin embargo, una vez capacitados, el 2AG no tuvo ningún efecto en la fosforilación de las proteínas. Estos resultados coinciden con los observados con la

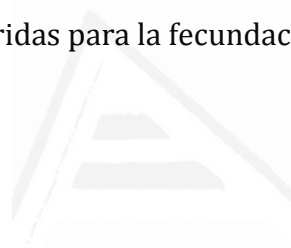


Met-AEA (metanandamida, análogo sintético de la AEA), la cual produce la inhibición de la capacitación a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  [159]. Por otra parte, nuestros datos inmunocitoquímicos mostraron que las concentraciones en las cuales el 2AG provoca la reacción acrosómica, decaen a medida que el espermatozoide se capacita. Así, en espermatozoides frescos el 2AG provoca la reacción acrosómica a partir de 100  $\mu\text{M}$ , en el *swim-up* a partir de 10  $\mu\text{M}$  y en espermatozoides capacitados a partir de 1  $\mu\text{M}$ . En este sentido, se ha demostrado que el plasma seminal contiene una cantidad considerable de endocannabinoides, y que esta decrece significativamente en los fluidos uterinos [191]. Así, las bajas concentraciones de endocannabinoides en el tracto genital femenino permitirían que los espermatozoides se capaciten fosforilando sus proteínas e impedirían que se produzca la reacción acrosómica antes del encuentro con el ovocito. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada por estudios posteriores.

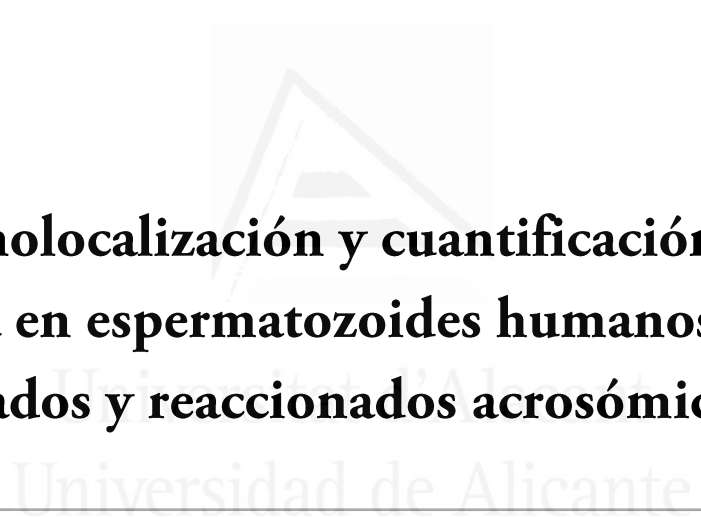
La reacción acrosómica es un evento clave en la fecundación, ya que se trata de la liberación de las enzimas proteolíticas que permiten al espermatozoide penetrar en la zona pelúcida y fusionar su membrana con el ovocito [217]. Los espermatozoides que se encuentren con el ovocito y no sean capaces de experimentar esta excitosis acrosomal, o que la sufran prematuramente, no podrán fertilizarlo [217]. Nuestros resultados revelaron que el 2AG y 2AGE (100  $\mu\text{M}$ ) producen la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos frescos. Además, el 2AGE-100 $\mu\text{M}$  causó una disminución significativa de la viabilidad, evaluada mediante la eosina-nigrosina. Esta técnica permite diferenciar a los espermatozoides vivos de los muertos por la integridad de su membrana plasmática [218]. Así, la desestructuración de la capa más externa en las células espermáticas muertas podría ser la razón de la pérdida del contenido acrosomal. Sin embargo, el 2AG-100  $\mu\text{M}$  provocó la inducción de la reacción acrosómica sin disminuir la viabilidad. En este sentido, el efecto del 2AG sobre la excitosis acrosomal, fue totalmente opuesto al que producen otros endocannabinoides. Por ejemplo, se ha demostrado que la AEA inhibe la reacción acrosómica en espermatozoides humanos [150], de cerdo [159] y de erizo [219]. Si bien el mecanismo de acción de los endocannabinoides en células espermáticas aún no está claro, se ha demostrado que la AEA y el 2AG se unen con diferentes afinidades

al receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) [139]. Así, la AEA tiene mayor afinidad por el CB1 que el 2AG, provocando la unión de la AEA preferentemente al CB1 [220]. La unión del CB1 a su antagonista inhibe los efectos de la AEA [159], sin embargo, aún no hay estudios que relacionen el bloqueo del CB2 y la exocitosis acrosomal. Estas evidencias sugieren que la AEA y 2AG se une con diferentes afinidades a los receptores de cannabinoides provocando efectos opuestos en la inducción de la reacción acrosómica.

En conclusión, hemos demostrado que el 2AG y 2AGE producen una disminución de la motilidad espermática y una inducción de la reacción acrosómica. Además, el 2AG afecta al proceso de capacitación por *swim-up* produciendo una disminución en la fosforilación de proteínas. Estos resultados sugieren que los cannabinoides tienen un importante papel en la regulación de las funciones espermáticas requeridas para la fecundación del ovocito.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**Inmunolocalización y cuantificación de  $\alpha$ -  
tubulina en espermatozoides humanos frescos,  
capacitados y reaccionados acrosómicamente**

---

## Resumen

---

La  $\alpha$ -tubulina es una proteína que compone los microtúbulos del flagelo y está implicada en la motilidad espermática. La capacitación y reacción acrosómica producen cambios en muchas proteínas del citoesqueleto, sin embargo, aún no se conocen las modificaciones que experimenta la  $\alpha$ -tubulina durante estos estados fisiológicos. El principal objetivo de este trabajo fue determinar los cambios que se producen en la expresión y localización subcelular de la  $\alpha$ -tubulina luego de la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides humanos. Nuestros datos mostraron que la  $\alpha$ -tubulina se localiza en el flagelo y pieza intermedia de los espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente. El área inmunomarcada de  $\alpha$ -tubulina disminuyó significativamente en los espermatozoides con reacción acrosómica. Nuestros datos sugieren que  $\alpha$ -tubulina está implicada en los procesos que preparan al espermatozoide para fertilizar al ovocito.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Introducción

---

El flagelo del espermatozoide está constituido por el axonema, una estructura proteica de nueve pares de microtúbulos periféricos rodeando a un par central [221]. Los microtúbulos están formados por heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina que están codificadas en familias pequeñas y multigénicas [222, 223]. En eucariotas, estas familias están evolutivamente muy conservadas, lo que supone un papel biológico importante en las funciones celulares [224]. A pesar de un limitado número de genes existe una gran diversidad de isotipos de  $\alpha$ - $\beta$  tubulina, ya que son modificadas post-traduccionalmente [225, 226]. Entre estas modificaciones existen algunas que son comunes a muchas proteínas: acetilación, palmitoilación, fosforilación y poliglutamilación [227]; y otras que son específicas de la tubulina: detirosilación y poliglicilación [228, 229]. Así, algunas de estas modificaciones son muy importantes para la funcionalidad de los microtúbulos, por ejemplo, la poliglutamilación de la  $\alpha$ -tubulina es un evento clave en la motilidad flagelar [230].

Cuando el espermatozoide es eyaculado no tiene la capacidad de fertilizar al ovocito, sino que la adquiere *in vivo* al atravesar el tracto genital femenino en proceso llamado capacitación [231, 232]. Esta maduración también se puede realizar *in vitro* mediante la incubación de los espermatozoides en un medio de cultivo y bajo condiciones específicas [233]. La capacitación produce cambios bioquímicos y moleculares que llevan al espermatozoide a hiperactivarse, produciendo patrones de motilidad no observados en la muestra en fresco [128, 234]. Por otra parte, una vez que el espermatozoide capacitado se ha unido a la zona pelúcida, ocurre un evento denominado reacción acrosómica [24]. Durante la reacción acrosómica se produce una exocitosis de enzimas hidrolíticas localizadas en el acrosoma, con el fin penetrar en la zona pelúcida y fusionar su membrana con la del ovocito [25]. Sin embargo, no se conocen todos los eventos involucrados en la capacitación y la reacción acrosómica, y la reorganización del citoesqueleto parece formar parte de estos cambios. Así, por ejemplo la capacitación *in vitro* en espermatozoides de mamíferos produce un aumento de la polimerización de actina

y una redistribución de sus epítomos [235]. Esta redistribución también fue observada en la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina luego de la inducción la reacción acrosómica de espermatozoides de cerdo [236]. Sin embargo, son muy poco conocidos los cambios producidos en la arquitectura celular y en las proteínas del citoesqueleto después de la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides humanos.

El principal objetivo de este trabajo fue determinar la localización subcelular y cuantificar el área marcada de  $\alpha$ -tubulina en espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Material y Métodos

---

## 1. Muestras seminales

Las muestras seminales fueron obtenidas del banco de semen del Instituto Bernabeu (Alicante) a partir de donantes sanos (18-35 años de edad; n=10) luego de 3-4 días de abstinencia sexual. Los voluntarios accedieron a la utilización de sus muestras para fines científicos, firmando un consentimiento informado, de acuerdo con los estándares éticos requeridos para tal fin.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos para que se produzca la licuefacción. Luego se realizó un seminograma completo de cada muestra, donde se evaluaron los parámetros: volumen, concentración, licuefacción, pH, motilidad, viabilidad y morfología; clasificándolas como normozoopérmicas de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud [2].

Capacitación. Swim-up. Los espermatozoides fueron lavados dos veces con el medio cultivo HAM (Gibco, Invitrogen, CA, USA) a 37 °C y centrifugados a 400 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de HAM fresco. Las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, manteniendo el tubo Falcon en una posición a 45°. Luego del tiempo de incubación, se recolectó los espermatozoides de la capa superior del medio cultivo. La eficiencia de la técnica fue evaluada mediante un microscopio de contraste de fases (Leica DMRB), descartando aquellas muestras que tenían ≤ 95 % de los espermatozoides móviles progresivos.

Reacción Acrosómica. Cada una de las alícuotas de las muestras capacitadas fueron incubadas con una mezcla de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Adrich, SL, USA) y CaCl<sub>2</sub>, ambos en una concentración final de 10 μM, durante 60 minutos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La eficacia de la reacción acrosómica fue evaluada mediante la técnica del isocianato de fluoresceína conjugada con la aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA dilución 1:20; Sigma-Adrich)[113].

## 2. Western Blot

El Western blot fue realizado con los extractos proteicos de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Para ello, cada alícuota fue lavada 2 veces con PBS. Se eliminó el sobrenadante, y se agregó 150  $\mu$ L de tampón de lisis (1% [v/v] Triton-X100 con 1 % [v/v] cóctel inhibidor de proteasas). Se centrifugó a 10.000 *g* por 10 minutos y se recogió el sobrenadante con las proteínas en suspensión. Las muestras proteicas fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso. La concentración proteica de cada muestra fue medida por el kit de ensayo de la BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Luego de la extracción, se ajustó la concentración a 20  $\mu$ g de proteína en cada extracto proteico con tampón de lisis. Se mezcló igual cantidad de muestra con el tampón de carga (Laemmli buffer 2X) y fue hervida durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12 % mediante un sistema de minigel (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA). Paralelamente a las muestras se corrió un marcador de peso molecular (Precision plus protein dual color standars; Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA). Posteriormente las bandas proteicas fueron visualizadas mediante la tinción de azul Commassie Brilliant para evaluar la eficiencia de la electroforesis.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, USA) mediante un sistema de transferencia semi-húmedo (C.B.S. Scientific company, Inc. CA, USA) durante 40 minutos a 400 mA. Esta membrana fue incubada con tampón de bloqueo (TBS-T conteniendo 1% [w/v] BSA) a 4 °C toda la noche. La incubación con el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -tubulina (T9026, Sigma-Adrich, SL, USA) (1:10.000 en tampón de bloqueo) se realizó a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizaron tres lavados con TBS-T y luego la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (1:2.000) (A-10677, Invitrogen, CA, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-T y se revelaron las bandas proteicas mediante el método colorimétrico de la DAB-peroxidasa (3,3-Diaminobencidina; Sigma-Adrich, SL, USA).



### 3. Inmunocitoquímica

Los espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y con reacción acrosómica (RA) fueron fijados en cubre objetos (8mm diámetro) con metanol (-20 °C) durante 5 o 40 minutos. También se realizó un segundo método de fijación: paraformaldehído (4% en PBS) por 30 minutos y permeabilización con Tritón 1X [v/v] durante diferentes tiempos: 5, 15 y 30 minutos. Cada muestra fue lavada dos veces con PBS e incubada con tampón de bloqueo (1% [p/v] BSA, 10% [v/v] suero fetal bovino) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo primario monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (T9026, Sigma-Adrich, SL, USA) (1:500 en tampón de bloqueo), a 4 °C durante toda la noche. Paralelamente se realizaron de cada muestra un control negativo donde el anticuerpo primario fue reemplazado por solución de bloqueo, y al igual que con el anticuerpo primario fue incubado durante toda la noche a 4 °C. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) e incubó con el anticuerpo secundario, anti-ratón DyLight 488 (711-205-152, Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK) (1:500 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS (3 x 5 min) y se montó las muestras con un medio de montaje Vecta Shield (Vector laboratories LTD., UK).

### 4. Procesamiento de imágenes

La inmunofluorescencia fue analizada utilizando un microscopio de láser confocal LEICA SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). El marcaje con DyLight 488 fue excitado usando el láser de argón 488 nm y para la detección del DAPI fue utilizado el láser unido al diodo de 405 nm. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Leica TCS SP2-PC. El ajuste del brillo, contraste y la medición del área marcada de  $\alpha$ -tubulina y flagelo fue realizado con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

## 5. Análisis Estadístico y cuantificación de espermatozoides

De cada muestra analizada se cuantificó el área marcada para  $\alpha$ -tubulina y flagelo de 200 espermatozoides. El porcentaje del área marcada para  $\alpha$ -tubulina/flagelo se expresó como la media  $\pm$  ESM (error estándar de la media). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS (SPSS para Windows, V11.0). La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias significativas entre las medias fueron evaluadas usando ANOVA (Análisis de Varianza) y test *post-hoc* de Turkey. Los valores comparados con una  $p < 0,05$  fueron considerados como diferencias significativas.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

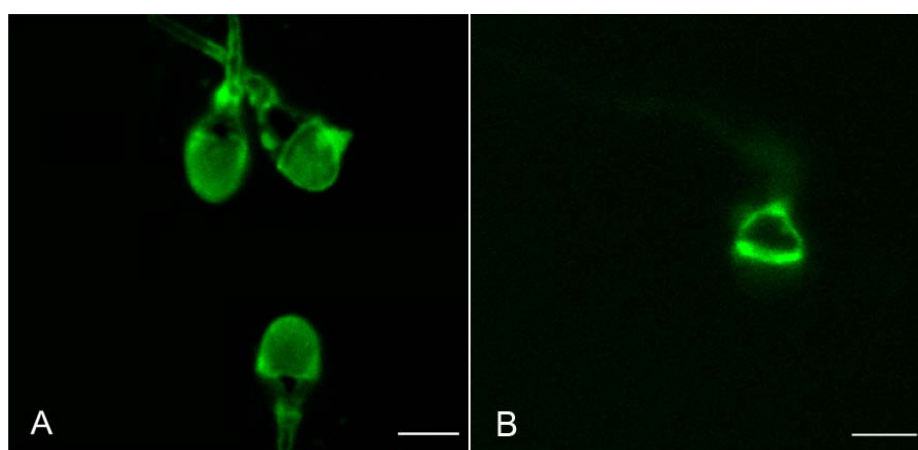
# Resultados

## 1. Evaluación de la reacción acrosómica: FITC-PSA

La eficacia de la reacción acrosómica inducida por ionóforo de calcio se realizó mediante la técnica FITC-PSA, donde se visualizaron los espermatozoides que perdieron el acrosoma y aquellos con el acrosoma intacto (Fig. 1). También se realizó un control sin el ionóforo para evaluar el porcentaje de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica espontáneamente. En la alícuota control (sin el ionóforo) solo el  $29,7 \pm 4,4$  % de los espermatozoides sufrieron la reacción acrosómica (RA espontánea), y este valor aumenta hasta el  $90,0 \pm 3,1$  % en la alícuota incubada con el ionóforo (RA inducida) (Tabla 1).

Muestra	Grupo 1: (-) RA	Grupo 2: (+) RA
Sin ionóforo (Control)	$70,3 \pm 4,1$ %	$29,7 \pm 4,4$ %
Con ionóforo	$10,0 \pm 3,3$ %	$90,0 \pm 3,1$ %

**Tabla 1:** Evaluación del porcentaje de espermatozoides que sufrieron reacción acrosómica. **Grupo 1:** espermatozoides con acrosoma (RA negativos). **Grupo 2:** espermatozoides sin acrosoma (RA positivos). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar.



**Figura 1.** Micrográficas confocales de espermatozoides humanos donde se evaluó la reacción acrosómica mediante la técnica FITC-PSA. **(A)** Espermatozoides humanos con el acrosoma intacto, reacción acrosómica negativa. **(B)** Espermatozoides humanos sin el contenido acrosomal, reacción acrosómica positiva. Barra de escala 3  $\mu$ m.

## 2. Detección por Western blot de la $\alpha$ -tubulina

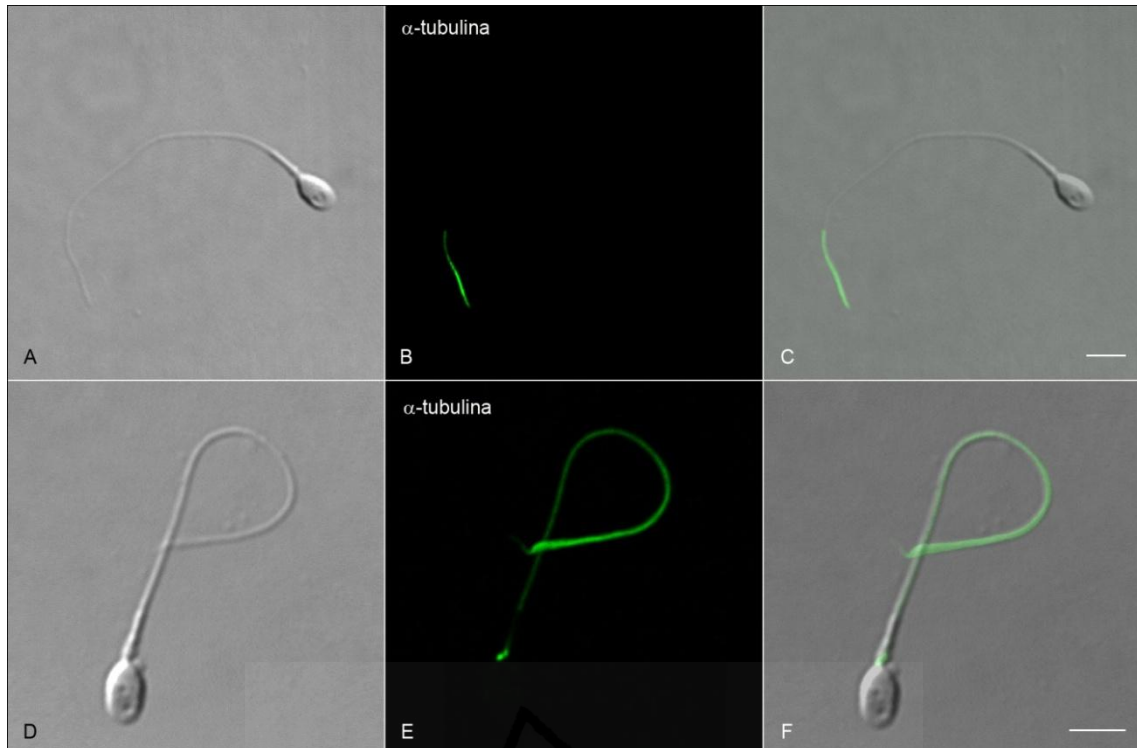
La detección de la presencia de la proteína  $\alpha$ -tubulina fue realizada en extractos proteicos de espermatozoides frescos, capacitados (CAP) y con reacción acrosómica (RA). Se localizó una banda inmunoreactiva para  $\alpha$ -tubulina entre 50 y 75 KDa según el marcador de peso molecular (Pm) (Fig. 2). Paralelamente se corrió el control negativo, donde la incubación con  $\alpha$ -tubulina se reemplazó por tampón de bloqueo, en esta calle no se observó ninguna banda (los datos no se muestran).



**Figura 2.** Detección por Western blot de  $\alpha$ -tubulina en espermatozoides frescos, capacitados (CAP) y reaccionados acrosómicamente (RA). En los tres extractos proteicos fue detectada una banda con un peso molecular de ~55 KDa. Pm, marcador de peso molecular.

## 3. Inmunolocalización de $\alpha$ -tubulina

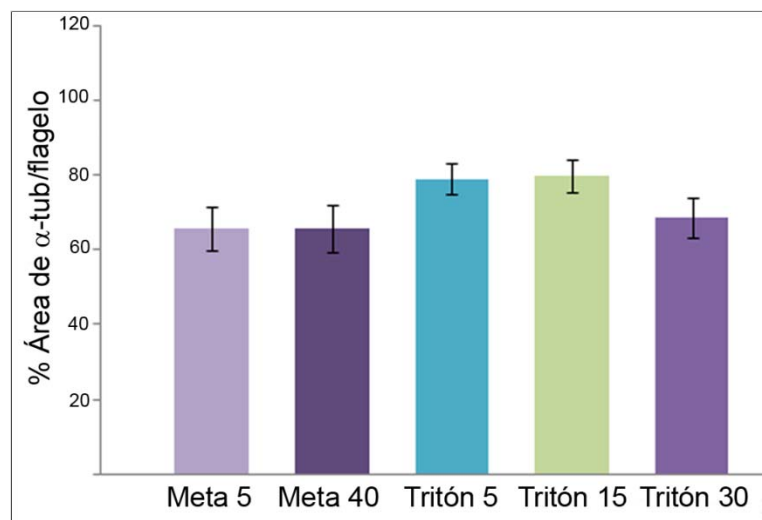
La inmunolocalización de  $\alpha$ -tubulina en diferentes especies de mamíferos aún no está bien definida. Algunos autores la sitúan solo en el flagelo [237], mientras que otros también la observaron en la cabeza del espermatozoide [238]. Por esta razón, hemos examinado la presencia de  $\alpha$ -tubulina mediante inmunocitoquímica en el espermatozoide humano. En este sentido, solo se evidenció reactividad para la  $\alpha$ -tubulina en el flagelo de espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica. Sin embargo, la distribución de esta proteína no fue homogénea dentro de las poblaciones espermáticas de cada grupo experimental. Así, hemos encontrado espermatozoides que presentan un marcaje para  $\alpha$ -tubulina solo en la pieza final (Fig. 3A-C), y otros donde la inmunoreactividad se encuentra en la mayoría del flagelo (Fig. 3D-E).



**Figura 3.** Inmunolocalización de  $\alpha$ -tubulina en espermatozoides humanos. (A-C) Inmunolocalización de la  $\alpha$ -tubulina en la pieza final del flagelo. (D-F) Inmunolocalización de la  $\alpha$ -tubulina a través de todo el flagelo. Barra de escala 5  $\mu$ m.

#### 4. Expresión inmunofluorescente de $\alpha$ -tubulina con diferentes métodos de fijación y permeabilización de la membrana del espermatozoide

Para confirmar que el método de fijación no influye en área inmunofluorescente obtenida, se realizaron controles con dos fijadores diferentes en espermatozoides frescos. También fue evaluado si el tiempo de permeabilización de la membrana tenía alguna influencia en la señal obtenida. Se cuantificó el área inmunofluorescente marcada de  $\alpha$ -tubulina respecto del área total del flagelo (área  $\alpha$ -tubulina/flagelo). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el área de  $\alpha$ -tubulina/flagelo, entre los espermatozoides fijados con metanol (5 o 40 min) y paraformaldehído/tritón (5, 15 y 30 min) (Fig. 4).



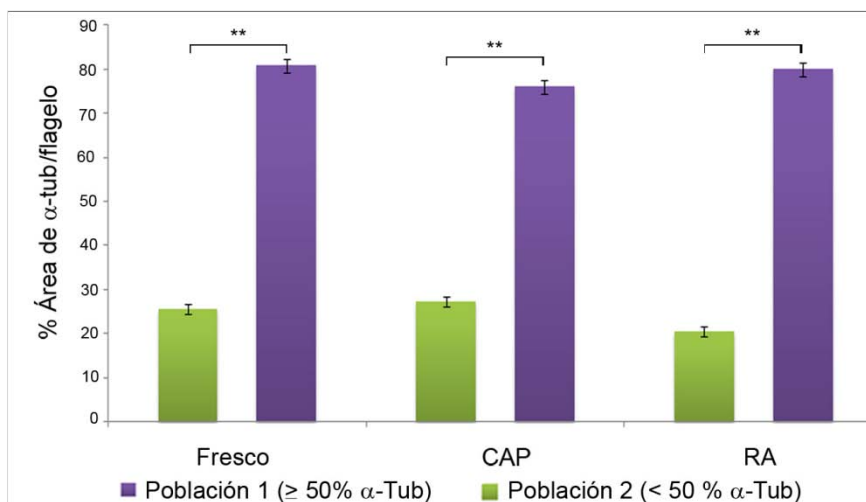
**Figura 4.** Porcentaje del área inmunomarcada para  $\alpha$ -tubulina/flagelo con los diferentes métodos de fijación y permeabilización. Meta 5 y 40: fijación con metanol durante 5 y 40 minutos. Tritón 5, 15 y 30: fijación con paraformaldehído 4 % y permeabilización con tritón 5, 15 o 30 minutos respectivamente. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

## 5. Cuantificación de la expresión inmunofluorescente de $\alpha$ -tubulina en espermatozoides en frescos, capacitados y con reacción acrosómica.

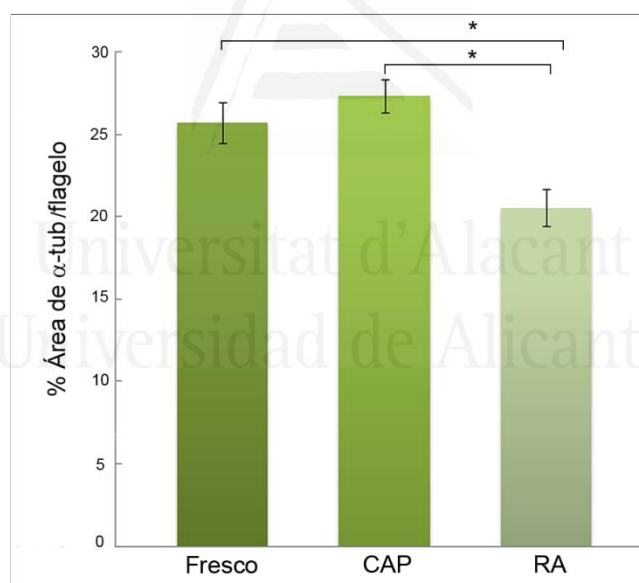
En cada grupo experimental, se identificaron dos subpoblaciones espermáticas ( $p < 0,05$ ). La población 1 expresó un área marcada de  $\alpha$ -tubulina mayor o igual al 50 % ( $\geq 50$  %) en relación a la totalidad del flagelo, y la población 2 un área marcada menor al 50% ( $< 50$  %) (Fig. 5).

En la población 2, se observó una disminución significativa en el área de  $\alpha$ -tubulina en el grupo RA cuando se lo compara con el fresco y CAP ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no hubo diferencias en el área marcada de  $\alpha$ -tubulina entre los espermatozoides frescos y CAP (Fig. 6).

En la población 1, no existieron diferencias significativas en el área marcada de  $\alpha$ -tubulina entre los tres grupos experimentales estudiados: fresco, CAP y con RA (los datos no se muestran).



**Figura 5.** Identificación de poblaciones espermáticas con diferente porcentaje de área marcada para  $\alpha$ -tubulina/flagelo en muestras en fresco, capacitadas (CAP) y con reacción acrosómica (RA). La población 1 tiene un porcentaje mayor o igual al 50% del área marcada para  $\alpha$ -tubulina/flagelo, mientras que la población 2 tiene un área menor al 50% del área marcada para  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. (\*\*)  $p < 0,01$ .



**Figura 6.** Porcentaje de área marcada para  $\alpha$ -tubulina/flagelo en espermatozoides frescos, capacitados (CAP) y con reacción acrosómica (RA), pertenecientes a la población 2 ( $< 50\%$  del área marcada de  $\alpha$ -tubulina/flagelo). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. (\*)  $p < 0,05$ .

## Discusión

---

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión y distribución de la  $\alpha$ -tubulina en los diferentes estadios fisiológicos de los espermatozoides previo a la interacción con el ovocito. Nuestros resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el área inmunofluorescente marcada para la  $\alpha$ -tubulina, con los diferentes métodos de fijación/permeabilización utilizados. Esto en parte se contradice con trabajos previos sobre la distribución de las proteínas del citoesqueleto, en donde se vio que las condiciones técnicas utilizadas, como el método de fijación/permeabilización entre otras, tenían efectos en la inmunodetección de esta proteína [119, 239]. Este resultado nos confirmó que las condiciones de trabajo no tuvieron influencia en la inmunodetección de la  $\alpha$ -tubulina.

Por otra parte, nuestros datos de inmunocitoquímica muestran que la  $\alpha$ -tubulina fue localizada en el flagelo y pieza intermedia de espermatozoides humanos. La distribución de la tubulina en espermatozoides de mamíferos es muy controversial. Dvorakova *et al.* [238] mostraron que la  $\alpha$ -tubulina puede también ser localizada en la cabeza de los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos, incluyendo el humano. Sin embargo, otros autores localizan la  $\alpha$ -tubulina solo en la pieza intermedia y flagelo [237, 240]. Luego de la capacitación y reacción acrosómica, no observamos modificaciones en la inmunolocalización de  $\alpha$ -tubulina, de acuerdo con otros autores [238]. Sin embargo en espermatozoides de cerdo, se produce una redistribución de los epítomos de  $\alpha$ -tubulina luego de la inducción de la reacción acrosómica [236].

Los espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica fueron clasificados en dos poblaciones dependiendo del área marcada con  $\alpha$ -tubulina. En este sentido, las proteínas del citoesqueleto son descriptas como blanco de las caspasas [241], y está demostrado que las poblaciones espermáticas con baja motilidad tienen una mayor actividad caspasa-positiva [242]. Por otra parte, la criopreservación de espermatozoides, además de reducir la motilidad espermática



produce un dramático aumento en la expresión de  $\alpha$ -tubulina [243]. Por lo tanto, dentro de una misma muestra heterogénea, los espermatozoides con baja motilidad podrían tener una mayor expresión de  $\alpha$ -tubulina y una alta actividad caspasa. Y al contrario, los espermatozoides altamente móviles, podrían tener una baja expresión de  $\alpha$ -tubulina y una menor actividad caspasa. Así, la actividad de las caspasas podría inducir la apoptosis de aquellos espermatozoides con alta expresión de  $\alpha$ -tubulina y de esta forma seleccionar aquellos espermatozoides con mayores posibilidades de fertilizar al ovocito.

En los espermatozoides capacitados no existieron diferencias en el área marcada de  $\alpha$ -tubulina con los espermatozoides en fresco. En un estudio previo con espermatozoides humanos, se cuantificó la expresión de  $\beta$ -tubulina y  $\alpha$ -tubulina por medio de electroforesis bidimensional y encontraron que en espermatozoides capacitados aumenta la expresión de  $\alpha$ -tubulina pero disminuye la expresión de  $\beta$ -tubulina [244]. Aunque este resultado es contradictorio, ya que esta proteína se encuentra como heterodímero de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en el flagelo de los espermatozoides. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que en la población 2, hay una disminución significativa en el área  $\alpha$ -tubulina de los espermatozoides reaccionados acrosómicamente. Se ha demostrado que la reacción acrosómica produce un reordenamiento de las proteínas del citoesqueleto [245, 246], y que estas participan de forma activa en la exocitosis del contenido acrosomal en células espermáticas [247, 248]. Además, las proteínas del citoesqueleto están directamente relacionadas con la reacción acrosómica. Por ejemplo la inhibición de la polimerización de actina bloquea la reacción acrosómica inducida por el ionóforo de calcio [249]. Así, la disminución de la expresión de  $\alpha$ -tubulina podría ser un hecho clave en la reacción acrosómica de espermatozoides humanos.

En conclusión, los datos presentados en este estudio sugieren que la  $\alpha$ -tubulina podría participar activamente en la reacción acrosómica de espermatozoides humanos. Por otra parte, hemos demostrado que en una misma muestra se pueden diferenciar dos poblaciones espermáticas, una con una baja y otra con alta expresión de  $\alpha$ -tubulina. Además, la  $\alpha$ -tubulina está directamente

relacionada con la motilidad espermática, por lo que la expresión de esta proteína podría ser un indicador de la capacidad fecundante del espermatozoide humano. No obstante, queda mucho por conocer sobre los cambios que se producen en la arquitectura celular del espermatozoide en las etapas tempranas de la fertilización.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **CONCLUSIONES**

# Conclusiones

---

A partir de los resultados y sus respectivas discusiones, exponemos las siguientes conclusiones:

Respecto a la *Identificación y localización subcelular de la Glutamina Sintetasa en espermatozoides humanos*

1. Por primera vez se describe la presencia de glutamina sintetasa en el espermatozoide humano, y esta se localiza específicamente en la región post-acrosomal de la teca perinuclear. Si bien existen datos sobre su presencia en espermatozoides de búfalo, aún se desconoce su funcionalidad.
2. Las muestras capacitadas y reaccionadas acrosómicamente presentan un mayor porcentaje de espermatozoides inmunoreactivos para la glutamina sintetasa. El aumento de células espermáticas con esta enzima podría deberse al mayor número de espermatozoides móviles que presentan estas muestras. Aunque el mecanismo por el cual esta enzima se relaciona con la motilidad no se conoce, podría estar vinculado con la producción energética como ocurre en otras células.

Respecto a la *Expresión y distribución subcelular del receptor de cannabinoide tipo 1 y tipo 2, en espermatozoides humanos frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente*

1. Solo un pequeño porcentaje de espermatozoides expresan en su membrana el receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1) o tipo 2 (CB2). Estos receptores están íntimamente relacionados con la regulación de canales de calcio, los cuales permiten el aumento intracelular de este catión durante las fases

tempranas de la capacitación espermática. Así, los espermatozoides que expresen estos receptores podrían ser los seleccionados para llegar a fecundar al ovocito, aunque esta hipótesis deberá ser confirmada.

2. El CB1 y CB2 se encuentran en los espermatozoides de las tres situaciones experimentales estudiadas. Esto sugiere la necesidad de la presencia de estos receptores en todo el proceso de maduración espermática a través del tracto genital femenino. En concreto, podrían actuar regulando la capacitación y reacción acrosómica.
3. En el proceso de capacitación y reacción acrosómica existe una redistribución espacial de los receptores de cannabinoides. Así, el CB1 se localiza principalmente en la región post-acrosomal de espermatozoides frescos y capacitados; y el CB2 en la región post-acrosomal y pieza intermedia. En los espermatozoides reaccionados acrosómicamente, el CB1 y el CB2 se localizan mayoritariamente en el flagelo. Esto parece indicar que el CB1 y CB2 presentan un desplazamiento desde la cabeza hacia el flagelo, a medida que el espermatozoide pasa por los diferentes estados fisiológicos previos a la interacción con el ovocito.

Respecto al *Efecto de los endocannabinoides, 2-araquidonilglicerol y 2-araquidonilglicerol éter, en las funciones in vitro del espermatozoide humano*

1. El 2-araquidonilglicerol y 2-araquidonilglicerol éter producen una disminución de la motilidad progresiva en espermatozoides humanos frescos. Este evento podría estar relacionado con un declive de la actividad mitocondrial, como ha sido demostrado en otros endocannabinoides y citado en la discusión.
2. Aunque se ha demostrado que algunos endocannabinoides producen la inhibición de la reacción acrosómica, nuestros datos muestran que el 2-araquidonilglicerol produce el efecto contrario. Esto podría deberse a las

diferentes afinidades de unión entre los endocannabinoides y sus receptores.

3. El 2-araquidonilglicerol causa una disminución del porcentaje de espermatozoides con fosforilación proteica. En este sentido, ha sido ampliamente demostrado que la fosforilación proteica es la principal modificación post-translacional implicada en el proceso de capacitación. Así, las bajas concentraciones de endocannabinoides encontradas en el tracto genital femenino permitirían que los espermatozoides se capaciten fosforilando sus proteínas.

Respecto a la *Inmunolocalización y cuantificación de  $\alpha$ -tubulina en espermatozoides humanos frescos, capacitados y reaccionados acrosómicamente*

1. Los espermatozoides frescos, capacitados y con reacción acrosómica pueden ser clasificados en dos poblaciones dependiendo del porcentaje de su flagelo inmunoreactivo para la  $\alpha$ -tubulina. Así, existe una población con la mitad o menos de su flagelo inmunoreactivo para  $\alpha$ -tubulina, y otra con más de la mitad. La expresión diferencial de  $\alpha$ -tubulina podría estar relacionada con procesos de selección negativa, donde los espermatozoides con alta expresión de tubulina serían blanco de las caspasas, las cuales mediarían la apoptosis de estas células.
2. En la población con baja expresión, la inmunoreactividad de  $\alpha$ -tubulina es aún menor en espermatozoides reaccionados acrosómicamente que en frescos y capacitados. En este sentido, el reordenamiento de muchas proteínas del citoesqueleto es un evento que sucede durante la reacción acrosómica. Así, la disminución de la expresión de  $\alpha$ -tubulina podría ser un hecho necesario para que se produzca la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. Sin embargo, esto deberá ser confirmado por estudios posteriores.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **REFERENCIAS**

# Referencias

---

1. Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 2010; 120:984-994.
2. World Health Organization DoRHaR. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva, Switzerland: WHO Press.; 2010.
3. De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005; 11:205-214.
4. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124:181-196.
5. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:697-698.
6. Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170:326.
7. Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991; 6:1265-1274.
8. Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:25-38.
9. Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 1991; 12:323-330.
10. Seshagiri PB, Mariappa D, Aladakatti RH. Tyrosine phosphorylated proteins in mammalian spermatozoa: molecular and functional aspects. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63:313-325.
11. Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 2011; 13:395-405.
12. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15:213-227.
13. Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250:36-42.
14. Robaire B, Seenundun S, Hamzeh M, Lamour SA. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian J Androl* 2007; 9:545-553.
15. Cooper TG. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl* 2007; 9:533-539.
16. Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 1980; 60:291-294.



17. Yeung CH, Cooper TG, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod* 1993; 49:274-280.
18. Yeung CH, Perez-Sanchez F, Soler C, Poser D, Kliesch S, Cooper TG. Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Hum Reprod Update* 1997; 3:205-213.
19. Patrizio P, Ord T, Silber SJ, Asch RH. Correlation between epididymal length and fertilization rate in men with congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61:265-268.
20. Arnheim N, Calabrese P. Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. *Nat Rev Genet* 2009; 10:478-488.
21. de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:175-194.
22. Katz DF, Vanagimachi R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod* 1980; 22:759-764.
23. Suarez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* 1987; 36:1191-1198.
24. Brucker C, Lipford GB. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* 1995; 1:51-62.
25. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 1999; 96:175-183.
26. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1571-1584.
27. Liu DY, Martic M, Clarke GN, Dunlop ME, Baker HW. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:941-949.
28. Hernandez-Gonzalez EO, Lecona-Valera AN, Escobar-Herrera J, Mujica A. Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 46:43-58.
29. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 2005; 129:263-268.
30. Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl* 2009; 32:25-45.
31. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121:1139-1150.

32. Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 55:207-216.
33. Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 1996; 180:284-296.
34. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; 53:133-150.
35. Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 2010; 588:4667-4672.
36. Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; 12:253-267.
37. Evans JP, Florman HM. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol* 2002; 4 Suppl:s57-63.
38. Westenbroek RE, Byers MR. Up-regulation of class A Ca<sup>2+</sup> channels in trigeminal ganglion after pulp exposure. *Neuroreport* 1999; 10:381-385.
39. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413:603-609.
40. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernandez-Gonzalez EO, Nishigaki T, Trevino CL, Wood C, Beltran C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; 131:977-988.
41. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56:707-719.
42. Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:304-314.
43. Devi KU, Jha K, Shivaji S. Plasma membrane-associated protein tyrosine phosphatase activity in hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:42-50.
44. Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:1017-1026.
45. Berruti G, Martegani E. Identification of proteins cross-reactive to phosphotyrosine antibodies and of a tyrosine kinase activity in boar spermatozoa. *J Cell Sci* 1989; 93 ( Pt 4):667-674.

46. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 2006; 21:1002-1008.
47. Grasa P, Colas C, Gallego M, Monteagudo L, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 2009; 137:655-667.
48. Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257-266.
49. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32:145-153.
50. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59:7-11.
51. Wolf DE, Hagopian SS, Ishijima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol* 1986; 102:1372-1377.
52. Shalgi R, Matityahu A, Gaunt SJ, Jones R. Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1990; 25:286-296.
53. Rochwerger L, Cuasnicu PS. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev* 1992; 31:34-41.
54. Uguz C, Vredenburg WL, Parrish JJ. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod* 1994; 51:1031-1039.
55. Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 1996; 173:510-520.
56. Garty NB, Salomon Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett* 1987; 218:148-152.
57. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1054:231-236.
58. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121:1129-1137.
59. Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 1999; 61:76-84.

60. Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl* 2009; 30:552-558.
61. Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970; 23:193-196.
62. Ishijima S, Baba SA, Mohri H, Suarez SS. Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:376-384.
63. Phillips DM. Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J Cell Biol* 1972; 53:561-573.
64. Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 1965; 149:424-426.
65. Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod* 1982; 26:745-763.
66. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 2012; 35:109-124.
67. Du J, Tao J, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Water volume and osmotic behaviour of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance. *J Reprod Fertil* 1994; 101:37-42.
68. Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl* 2003; 24:790-803.
69. Lindemann CB, Goltz JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100--extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988; 10:420-431.
70. White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 1989; 22:163-177.
71. Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol* 2002; 250:208-217.
72. San Agustin JT, Witman GB. Role of cAMP in the reactivation of demembrated ram spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; 27:206-218.
73. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 1996; 55:684-692.
74. Si Y, Olds-Clarke P. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 2000; 62:1231-1239.
75. Brokaw CJ. Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; 18:123-130.

76. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305:609-613.
77. Jensen TK, Joffe M, Scheike T, Skytthe A, Gaist D, Christensen K. Time trends in waiting time to pregnancy among Danish twins. *Hum Reprod* 2005; 20:955-964.
78. Richiardi L, Bellocco R, Adami HO, Torrang A, Barlow L, Hakulinen T, Rahu M, Stengrevics A, Storm H, Tretli S, Kurtinaitis J, Tyczynski JE, et al. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:2157-2166.
79. Vilorio T, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defenses but does not cause oxidative DNA damage in infertile men. *Fertil Steril* 2010; 94:631-637.
80. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol* 2011; 45:403-409.
81. Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40:633-652.
82. Check JH. Treatment of male infertility. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34:201-206.
83. Palermo GD, Neri QV, Monahan D, Kocent J, Rosenwaks Z. Development and current applications of assisted fertilization. *Fertil Steril* 2012; 97:248-259.
84. Halliday J. Outcomes for offspring of men having ICSI for male factor infertility. *Asian J Androl* 2012; 14:116-120.
85. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004; 19:2052-2059.
86. Labow BI, Souba WW. Glutamine. *World J Surg* 2000; 24:1503-1513.
87. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr* 2001; 131:2467S-2474S; discussion 2486S-2467S.
88. Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 1935; 29:1951-1969.
89. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7:357-368.
90. Vardimon L. Neuroprotection by glutamine synthetase. *Isr Med Assoc J* 2000; 2 Suppl:46-51.
91. Riepe RE, Norenburg MD. Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 1977; 268:654-655.

92. Haussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J* 1990; 267:281-290.
93. Wagenmakers AJ. Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv Exp Med Biol* 1998; 441:307-319.
94. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1995; 15:133-159.
95. Frayn KN, Khan K, Coppack SW, Elia M. Amino acid metabolism in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Clin Sci (Lond)* 1991; 80:471-474.
96. Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Res Vet Sci* 2011.
97. Darcy-Vrillon B, Posho L, Morel MT, Bernard F, Blachier F, Meslin JC, Duee PH. Glucose, galactose, and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development. *Pediatr Res* 1994; 36:175-181.
98. Haussinger D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul* 1986; 25:159-180.
99. Hong RW, Rounds JD, Helton WS, Robinson MK, Wilmore DW. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann Surg* 1992; 215:114-119.
100. Kimura RE. Glutamine oxidation by developing rat small intestine. *Pediatr Res* 1987; 21:214-217.
101. Gunnarsen D, Haley B. Detection of glutamine synthetase in the cerebrospinal fluid of Alzheimer diseased patients: a potential diagnostic biochemical marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:11949-11953.
102. Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:44-53.
103. Le Prince G, Delaere P, Fages C, Lefrancois T, Touret M, Salanon M, Tardy M. Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem Res* 1995; 20:859-862.
104. He Y, Hakvoort TB, Kohler SE, Vermeulen JL, de Waart DR, de Theije C, ten Have GA, van Eijk HM, Kunne C, Labruyere WT, Houten SM, Sokolovic M, et al. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *J Biol Chem* 2010; 285:9516-9524.
105. Gupta A, Mahdi AA, Ahmad MK, Shukla KK, Jaiswer SP, Shankhwar SN. 1H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 54:106-113.
106. Tomlins AM, Foxall PJ, Lynch MJ, Parkinson J, Everett JR, Nicholson JK. High resolution 1H NMR spectroscopic studies on dynamic biochemical processes in incubated human seminal fluid samples. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379:367-380.

107. Al Ahmad MZ, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:429-436.
108. de Mercado E, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 115:149-157.
109. Khlifiaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A, Tainturier D. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 2005; 63:138-149.
110. Renard P, Grizard G, Griveau JF, Sion B, Boucher D, Le Lannou D. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine. *Cryobiology* 1996; 33:311-319.
111. Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WM. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:347-357.
112. Kvidera MD, Carey GB. Glutamine synthetase activity in rat epididymis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206:360-364.
113. Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 1989; 41:635-641.
114. Lecuyer C, Dacheux JL, Hermand E, Mazeman E, Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol Reprod* 2000; 63:1801-1810.
115. Dvorakova K, Moore HD, Sebkova N, Palecek J. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* 2005; 130:61-69.
116. von Bulow M, Heid H, Hess H, Franke WW. Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1995; 219:407-413.
117. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Kyono K, Yao R, Noda T, Toshimori K. Appearance of an oocyte activation-related substance during spermatogenesis in mice and humans. *Hum Reprod* 2010; 25:2734-2744.
118. Ito C, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T, Toshimori K. Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum Reprod* 2009; 24:2588-2595.
119. Fouquet JP, Kann ML, Dadoune JP. Immunoelectron microscopic distribution of actin in hamster spermatids and epididymal, capacitated and acrosome-reacted spermatozoa. *Tissue Cell* 1990; 22:291-300.
120. Hess H, Heid H, Franke WW. Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol* 1993; 122:1043-1052.

121. Hess H, Heid H, Zimbelmann R, Franke WW. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp Cell Res* 1995; 218:174-182.
122. Heid H, Figge U, Winter S, Kuhn C, Zimbelmann R, Franke W. Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* 2002; 279:177-187.
123. Wu AT, Sutovsky P, Xu W, van der Spoel AC, Platt FM, Oko R. The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport. *Dev Biol* 2007; 312:471-483.
124. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol* 2009; 83:2-7.
125. Manandhar G, Toshimori K. Fate of postacrosomal perinuclear theca recognized by monoclonal antibody MN13 after sperm head microinjection and its role in oocyte activation in mice. *Biol Reprod* 2003; 68:655-663.
126. Mujica A, Navarro-Garcia F, Hernandez-Gonzalez EO, De Lourdes Juarez-Mosqueda M. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Tech* 2003; 61:76-87.
127. Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003; 61:362-378.
128. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:108.
129. Froman DP, Wardell JC, Feltmann AJ. Sperm mobility: deduction of a model explaining phenotypic variation in roosters (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 2006; 74:487-491.
130. Watford M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. *J Nutr* 2008; 138:2003S-2007S.
131. Dietz C, Hinsch E, Loffler M. Immunocytochemical detection of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in human spermatozoa. *Int J Androl* 2000; 23:294-299.
132. Carrey EA, Dietz C, Glubb DM, Loffler M, Lucocq JM, Watson PF. Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002; 123:757-768.
133. Ronquist G, Stegmayr B, Niklasson F. Sperm motility and interactions among seminal uridine, xanthine, urate, and ATPase in fertile and infertile men. *Arch Androl* 1985; 15:21-27.
134. Niemeyer T, Dietz C, Fairbanks L, Schroeder-Printzen I, Henkel R, Loeffler M. Evaluation of uridine metabolism in human and animal spermatozoa. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006; 25:1215-1219.



135. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* 2000; 108:1-13.
136. Bari M, Battista N, Fezza F, Gasperi V, Maccarrone M. New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6:257-268.
137. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:873-884.
138. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74:129-180.
139. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:161-202.
140. Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. *Neuro Endocrinol Lett* 2009; 30:153-179.
141. Yamaguchi F, Macrae AD, Brenner S. Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. *Genomics* 1996; 35:603-605.
142. Matias I, Bisogno T, Melck D, Vandenbulcke F, Verger-Bocquet M, De Petrocellis L, Sergheraert C, Breton C, Di Marzo V, Salzet M. Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 87:145-159.
143. Faure L, Coulon D, Laroche-Traineau J, Le Guedard M, Schmitter JM, Testet E, Lessire R, Bessoule JJ. Discovery and characterization of an *Arabidopsis thaliana* N-acylphosphatidylethanolamine synthase. *J Biol Chem* 2009; 284:18734-18741.
144. Elphick MR, Egertova M. The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling. *Handb Exp Pharmacol* 2005:283-297.
145. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346:561-564.
146. Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem* 2010; 17:1382-1393.
147. Thakur GA, Nikas SP, Makriyannis A. CB1 cannabinoid receptor ligands. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5:631-640.
148. Cacciola G, Chioccarelli T, Mackie K, Meccariello R, Ledent C, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G. Expression of type-1 cannabinoid receptor during rat postnatal testicular development: possible involvement in adult leydig cell differentiation. *Biol Reprod* 2008; 79:758-765.
149. Fride E. The endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre- and postnatal life. *Eur J Pharmacol* 2004; 500:289-297.

150. Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:984-991.
151. Agirregoitia E, Carracedo A, Subiran N, Valdivia A, Agirregoitia N, Peralta L, Velasco G, Irazusta J. The CB(2) cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertil Steril* 2010; 93:1378-1387.
152. Aquila S, Guido C, Santoro A, Perrotta I, Laezza C, Bifulco M, Sebastiano A. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of the cannabinoid1 receptor and a potential role of anandamide in sperm survival and acrosome reaction. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293:298-309.
153. Barboni B, Bernabo N, Palestini P, Botto L, Pistilli MG, Charini M, Tettamanti E, Battista N, Maccarrone M, Mattioli M. Type-1 cannabinoid receptors reduce membrane fluidity of capacitated boar sperm by impairing their activation by bicarbonate. *PLoS One* 2011; 6:e23038.
154. Ricci G, Cacciola G, Altucci L, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G. Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153:320-322.
155. Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Mahony MC, Giuffrida A, Picone RP, Makriyannis A. Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; 63:376-387.
156. Howlett AC. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:607-634.
157. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2005:53-79.
158. Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 2006; 85:653-660.
159. Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci* 2005; 118:4393-4404.
160. Filppula S, Yaddanapudi S, Mercier R, Xu W, Pavlopoulos S, Makriyannis A. Purification and mass spectroscopic analysis of human CB2 cannabinoid receptor expressed in the baculovirus system. *J Pept Res* 2004; 64:225-236.
161. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One* 2009; 4:e4579.
162. Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agro A. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 2003; 144:20-28.

163. Gye MC, Kang HH, Kang HJ. Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Arch Androl* 2005; 51:247-255.
164. Meizel S. The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; 79:713-732.
165. Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C, Irazusta J. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4969-4975.
166. Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003; 49:321-327.
167. Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52:473-480.
168. Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R, Beltran C. Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 2005; 243:79-172.
169. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1996; 1:d189-205.
170. Patrat C, Auer J, Fauque P, Leandri RL, Jouannet P, Serres C. Zona pellucida from fertilised human oocytes induces a voltage-dependent calcium influx and the acrosome reaction in spermatozoa, but cannot be penetrated by sperm. *BMC Dev Biol* 2006; 6:59.
171. Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 2008; 52:503-510.
172. Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:139-144.
173. Ren D, Xia J. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25:165-175.
174. Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet* 1998; 352:1611-1616.
175. Sharpe P, Smith G. Cannabis: time for scientific evaluation of this ancient remedy? *Anesth Analg* 2000; 90:237-240.
176. UNDOC. World Drug Report 2010. In. United Nations, New York: United Nations Office on drugs and crime; 2010.
177. Klempova D SA, Vicente J, Barrio G, Domingo A, Suelves MJ, Llorens N, Prieto L, Brime B, Ramirez V Consumo problemático de cannabis en estudiantes españoles de 14-18 años: validación de escalas. Madrid España; 2009.
178. Consroe P, Musty R, Rein J, Tillery W, Pertwee R. The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1997; 38:44-48.

179. Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, Thompson A, Group UMR. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362:1517-1526.
180. Vaney C, Heinzl-Gutenbrunner M, Jobin P, Tschopp F, Gattlen B, Hagen U, Schnelle M, Reif M. Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Mult Scler* 2004; 10:417-424.
181. Zajicek JP, Apostu VI. Role of cannabinoids in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25:187-201.
182. Campbell VA, Gowran A. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* 2007; 152:655-662.
183. Krishnan S, Cairns R, Howard R. Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD007204.
184. Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 2011; 79:964-973.
185. Cotter J. Efficacy of Crude Marijuana and Synthetic Delta-9-Tetrahydrocannabinol as Treatment for Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: A Systematic Literature Review. *Oncol Nurs Forum* 2009; 36:345-352.
186. Van Ryckeghem F, Van Belle S. Management of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Acta Clin Belg* 2010; 65:305-310.
187. Leung L. Cannabis and its derivatives: review of medical use. *J Am Board Fam Med* 2011; 24:452-462.
188. Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005:147-185.
189. Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, Johnson MR, Melvin LS, Mechoulam R, Ward SJ. Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40:471-478.
190. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258:1946-1949.
191. Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids* 2002; 121:211-227.
192. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997; 388:773-778.

193. Chang MC, Berkery D, Schuel R, Laychock SG, Zimmerman AM, Zimmerman S, Schuel H. Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 1993; 36:507-516.
194. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S163-171.
195. Sidhpura N, Parsons LH. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. *Neuropharmacology* 2011; 61:1070-1087.
196. Downer EJ. Cannabinoids and innate immunity: taking a toll on neuroinflammation. *ScientificWorldJournal* 2011; 11:855-865.
197. Batkai S, Pacher P. Endocannabinoids and cardiac contractile function: pathophysiological implications. *Pharmacol Res* 2009; 60:99-106.
198. Borrelli F, Izzo AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23:33-49.
199. Schuel H, Burkman LJ. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol Reprod* 2005; 73:1078-1086.
200. Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev* 2006; 27:427-448.
201. Taylor AH, Ang C, Bell SC, Konje JC. The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2007; 13:501-513.
202. Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, Maccarrone M. Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *J Neuroendocrinol* 2008; 20 Suppl 1:82-89.
203. Rossato M, Pagano C, Vettor R. The cannabinoid system and male reproductive functions. *J Neuroendocrinol* 2008; 20 Suppl 1:90-93.
204. Habayeb OM, Taylor AH, Finney M, Evans MD, Konje JC. Plasma anandamide concentration and pregnancy outcome in women with threatened miscarriage. *JAMA* 2008; 299:1135-1136.
205. Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N Engl J Med* 1974; 290:872-874.
206. Cone EJ, Johnson RE, Moore JD, Roache JD. Acute effects of smoking marijuana on hormones, subjective effects and performance in male human subjects. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24:1749-1754.
207. Yanagimachi R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 38:27-33.
208. Benoff S. Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:453-471.

209. Kang-Decker N, Mantchev GT, Juneja SC, McNiven MA, van Deursen JM. Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* 2001; 294:1531-1533.
210. Schuelke M, Krude H, Finckh B, Mayatepek E, Janssen A, Schmelz M, Trefz F, Trijbels F, Smeitink J. Septo-optic dysplasia associated with a new mitochondrial cytochrome b mutation. *Ann Neurol* 2002; 51:388-392.
211. Jha KN, Salicioni AM, Arcelay E, Chertihin O, Kumari S, Herr JC, Visconti PE. Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:781-789.
212. Perez LE, Smith CG, Asch RH. delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits fructose utilization and motility in human, rhesus monkey, and rabbit sperm in vitro. *Fertil Steril* 1981; 35:703-705.
213. Sarafian TA, Kouyoumjian S, Khoshaghideh F, Tashkin DP, Roth MD. Delta 9-tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:L298-306.
214. Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated with Human Sperm Motility. *Urology* 2012.
215. Ruiz-Pesini E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol* 2007; 77:3-19.
216. Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:245-259.
217. Mayorga LS, Tomes CN, Belmonte SA. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 2007; 59:286-292.
218. Bjorndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 2003; 18:813-816.
219. Schuel H, Goldstein E, Mechoulam R, Zimmerman AM, Zimmerman S. Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7678-7682.
220. Brizzi A, Cascio MG, Frosini M, Ligresti A, Aiello F, Biotti I, Brizzi V, Pertwee RG, Corelli F, Di Marzo V. Resorcinol-sn-glycerol derivatives: novel 2-arachidonoylglycerol mimetics endowed with high affinity and selectivity for cannabinoid type 1 receptor. *J Med Chem* 2011; 54:8278-8288.
221. Amos L, Klug A. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* 1974; 14:523-549.
222. Raff EC. Genetics of microtubule systems. *J Cell Biol* 1984; 99:1-10.
223. Luduena RF, Banerjee A, Khan IA. Tubulin structure and biochemistry. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:53-57.

- 
224. Kierszenbaum AL. Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. *Mol Reprod Dev* 2002; 62:1-3.
225. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 1998; 178:207-275.
226. Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol* 2000; 10:R801-803.
227. MacRae TH. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 1997; 244:265-278.
228. McKean PG, Vaughan S, Gull K. The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci* 2001; 114:2723-2733.
229. Quinones GB, Danowski BA, Devaraj A, Singh V, Ligon LA. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol Biol Cell* 2011; 22:1045-1057.
230. Gagnon C, White D, Cosson J, Huitorel P, Edde B, Desbruyeres E, Paturle-Lafanechere L, Multigner L, Job D, Cibert C. The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J Cell Sci* 1996; 109 ( Pt 6):1545-1553.
231. Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 2009; 485:72-81.
232. Tulsiani DR, Abou-Haila A. Molecular events that regulate mammalian fertilization. *Minerva Ginecol* 2011; 63:103-118.
233. Mahadevan M BG. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. *Clinical In Vitro Fertilization*. Springer-Berlag, Berlin; 1984: 83-97.
234. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52:463-472.
235. Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 2003; 68:837-845.
236. Palecek J, Peknicova J, Vitu M. Changes in immunochemical localization of cytoskeletal proteins in human and boar spermatozoa before and after acrosome reaction. *Folia Biol (Praha)* 1999; 45:13-20.
237. Peknicova J, Kubatova A, Sulimenko V, Draberova E, Viklicky V, Hozak P, Draber P. Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III beta-tubulin epitope in sperm tail. *Biol Reprod* 2001; 65:672-679.
238. Dvorakova K, Palecek J, Peknicova J. Changes in immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after acrosome reaction induced by specific cytoskeletal inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 2001; 47:18-27.
-

239. Fouquet JP, Kann ML. Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: fact or artifact? *Microsc Res Tech* 1992; 20:251-258.
240. Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Lehto VP. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol* 1984; 99:1083-1091.
241. Faleiro L, Lazebnik Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 2000; 151:951-959.
242. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:984-991.
243. Desrosiers P, Legare C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertil Steril* 2006; 85:1744-1752.
244. Secciani F, Bianchi L, Ermini L, Cianti R, Armini A, La Sala GB, Focarelli R, Bini L, Rosati F. Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm. *J Proteome Res* 2009; 8:3377-3389.
245. Fouquet JP, Fraile B, Kann ML. Sperm actin and calmodulin during fertilization in the hamster: an immune electron microscopic study. *Anat Rec* 1991; 231:316-323.
246. Bastian Y, Roa-Espitia AL, Mujica A, Hernandez-Gonzalez EO. Calpain modulates capacitation and acrosome reaction through cleavage of the spectrin cytoskeleton. *Reproduction* 2010; 140:673-684.
247. Brewis IA, Moore HD. Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12:156-165.
248. de Lourdes Juarez-Mosqueda M, Mujica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol* 1999; 128:225-236.
249. Lin M, Hess R, Aitken RJ. Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. *Reproduction* 2002; 124:107-117.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ANEXOS**

# Anexo I

---

Artículos científicos, comunicaciones a congresos y premios derivados de esta tesis doctoral.

## **PUBLICACIONES**

### **ARTÍCULOS ACEPTADOS PARA PUBLICACIÓN**

IDENTIFICATION AND CELLULAR LOCATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN HUMAN SPERM.

Francou MM, Hombrebueno JM, De Juan J. Revista: Cell and Tissue Research, 2012.

### **ARTÍCULOS EN PRODUCCIÓN**

DISTRIBUTION OF CANNABINOID RECEPTORS (CB1, CB2) IN FRESH, CAPACITATED AND ACROSOME REACTED HUMAN SPERM.

### **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

06/2011. TERMIS EU, 2011 Annual Meeting, Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society. Granada, España.

Póster: "DIFFERENCES IN FLAGELLAR  $\alpha$ -TUBULIN EXPRESSION IN FRESH, CAPACITATED AND ACROSOME-REACTED HUMAN SPERM".

Francou MM, Gómez-Torres MJ, Girela JL, García-Hernandez E, Ten J, Bernabeu R, De Juan J.

10/2011 VI Congreso de ASEBIR, Girona, España

Comunicación oral: "PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANABINOIDES, CB1 Y CB2, EN ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS FRESCOS, CAPACITADOS Y REACCIONADOS ACROSÓMICAMENTE"

M.M. Francou, E. García-Hernandez, J.L. Girela, M.J. Gómez-Torres, J. Ten, R. Bernabeu, J. De Juan.

Póster: “EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES, 2-ARAQUIDONILGLICEROL (2-AG) Y 2-ARAQUIDONILGLICEROL ÉTER (2-AGE), EN LAS FUNCIONES IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS”

M.M. Francou, E. García-Hernandez, J.L. Girela, M.J. Gómez-Torres, J. Ten, R. Bernabeu, J. De Juan.

### **PREMIOS**

Innovación, Calidad e Imagen en Reproducción Asistida (iCIRA). Merck-Serono 2010/11. Primer premio en la categoría: Aporte de Datos relevantes en el tratamiento de la reproducción asistida.

DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES (CB1 Y CB2) EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO: SU IMPLICACIÓN EN LA MOTILIDAD.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## Anexo II

\* Inmunocitoquímica

ANTICUERPO 1º/LECTINA	HOST	FUENTE	CÓDIGO	DILUCIÓN
<b>FITC-PSA</b> Lectina del <i>pisum sativum</i>	-	Sigma	L0770	1:20
<b>Glutamina sintetasa (GS)</b>	Monoclonal ratón	Sigma	G2781	1:10000
<b>Receptor de cannabinoide tipo 1 (CB1)</b>	Policlonal conejo	Santa Cruz	Sc20754	1:100*/ 1:5000**
<b>Receptor de cannabinoide tipo 2 (CB2)</b>	Policlonal conejo	Cayman Chemicals	101 550	1:500*/1:10000**
<b>α-fosfotirosina</b>	Monoclonal ratón	Sigma	P4110	1:500
<b>α-tubulina</b>	Monoclonal ratón	Sigma	T9026	1:500*/1:10000**

\*\* Western blot

ANTICUERPO 2º	HOST	Reactividad	FUENTE	CODIGO	DILUCIÓN
<b>DyLight 488</b>	Cabra	anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	711-205-152	1:500
<b>DyLight 549</b>	Cabra	anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	711-505-152	1:500
<b>Conjugado peroxidasa (HRP)</b>	Cabra	anti-conejo	Invitrogen	G-21234	1:2000
<b>Conjugado peroxidasa (HRP)</b>	Cabra	anti-ratón	Invitrogen	A-10677	1:2000

## Anexo III

---

Abreviaturas utilizadas en la tesis doctoral

**2AG**, 2 araquidonilglicerol

**2AGE**, 2 araquidonilglicerol éter

**AC**, adenil ciclase

**AEA**, N-araquidonil-etanolamina

**AKAPs**, proteín quinasas

**AMPc**, adenosín monofosfato cíclico

**ANOVA**, análisis de la varianza

**ATP**, adenosín trifosfato

**BSA**, albúmina sérica bovina

**CAP**, capacitado

**CB1**, receptor de cannabinoide tipo 1

**CB2**, receptor de cannabinoide tipo 2

**CC**, canales calcio

**CCMA**, canales de calcio en la membrana acrosomal

**CP**, par central de microtúbulos

**DA**, brazos de dineína

**DAB**, 3, 3' diaminobencidina

**DAPI**, 4',6-diamidino-2, fenilindol dihidrocloruro.

**EMS**, error estándar de la media

**FITC**, Isotiocianato de fluoresceína

**FS**, vaina fibrosa

**GS**, glutamina sintetasa



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**HRP**, peroxidasa de rábano

**HSA**, alúmina sérica humana

**IP3**, inositol trifosfato

**LH**, hormona leutinizante

**MNP**, motilidad no progresiva

**MP**, motilidad progresiva

**MS**, vaina mitocondrial

**NM**, no móviles

**ODFs**, fibras densas externas

**OMDA**, pares de microtúbulos externos

**OMS**, Organización Mundial de la Salud

**PAS-PT**, región post-acrosomal de la teca perinuclear

**PKA**, proteín quinasa A

**PM**, membrana plasmática

**Pm**, peso molecular

**PSA**, lectina proveniente del guisante (*pisum sativum*)

**PT**, teca perinuclear

**PVDF**, polivinilideno fluoruro

**PVS**, espacio perivitelino

**RA**, reacción acrosómica

**sAC**, adenil ciclasa soluble

**TBS-T**, tampón salino de Tris y Tween-20

**THC**,  $\Delta^9$  tetrahidrocannabinol

**ZP**, zona pelúcida

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha acordó otorgar, por..... a la Tesis Doctoral de Don/Dña..... la calificación de.....

Alicante.....de..... de.....

El Secretario,



El Presidente,

Universitat d'Alacant  
UNIVERSIDAD DE ALICANTE  
CEDIP

La presente Tesis de D. \_\_\_\_\_ ha sido registrada con el nº \_\_\_\_\_ del registro de entrada correspondiente.

Alicante \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

El Encargado del Registro,