



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

*Caracterización de propiedades mecánicas en la membrana
plasmática de espermatozoides de ratón como resultado de la
remoción de colesterol*

Tesis que presenta

Ing. Manuel Martínez Ruiz

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis

Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2013

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme otorgado una Beca durante mi formación académica.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A todos los profesores y compañeros de CINVESTAV Monterrey, que con sus conocimientos, consejos y paciencia colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

*A Blanca Estela Ruiz Arellano, mi madre, por su
motivación y apoyo constante.*

*A Mynet, Gael y Marcelino, mis hermanos, por
su tiempo y su motivación.*

*A Nubia, mi mejor amiga, por un sueño
compartido.*

RESUMEN

Uno de los primeros eventos que se llevan a cabo durante el proceso de capacitación de los espermatozoides es la remoción de colesterol de la membrana plasmática. Existen evidencias que sugieren que la remoción de colesterol puede estar impactando sobre las propiedades mecánicas de la membrana haciéndola menos rígida ya que la composición lipídica de los espermatozoides de ratón esta principalmente constituida por lípidos insaturados. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es explorar el efecto de la remoción de colesterol sobre las propiedades mecánicas de la membrana del espermatozoide, caracterizado por su módulo de elasticidad (E). Se utilizó la técnica de Microscopía de Barrido por Conductancia Iónica (SICM) en combinación con la generación de un “*jet*” de líquido para deformar la membrana plasmática de los espermatozoides de ratón y calcular los módulos de elasticidad. Para remover el colesterol de la membrana plasmática se utilizaron dos moléculas aceptoras, Metil- β -ciclodextrina ($M\beta CD$) y Albumina de Suero Bovino (BSA). Se observó que los espermatozoides presentan un módulos de elasticidad elevado ($E \sim 200\text{kPa}$), el cual no se ve alterado por la remoción de colesterol de la membrana. Aunado a esto se tomó evidencia del grosor de la cabeza como un parámetro de control con el cual comparar las magnitudes de las deformaciones obtenidas en nuestros registros e inesperadamente se observó un incremento en el grosor de las células que fueron tratadas con $M\beta CD$ y las que fueron tratadas con BSA adicionadas con NaHCO_3 . El hecho de que en la célula no cambie su rigidez al remover el colesterol y el aumento detectado en el grosor de la célula podría deberse al incremento en la polimerización de fibras de actina que ocurre durante el proceso de capacitación. Es importante mencionar que los espermatozoides de ratón son células muy rígidas y poco deformables, ya que siendo células completamente diferenciadas y muy compactas, carecen prácticamente de citoplasma, por lo que la membrana plasmática interacciona estrechamente con el citoesqueleto, contribuyendo con esto a que se observen módulos de elasticidad relativamente altos comparados con los observados para otros tipos celulares.

ABSTRACT

One of the first events to take place during the sperm capacitation process is the cholesterol removal from the plasma membrane. There is evidence suggesting that the cholesterol removal could affect the membrane's mechanical properties reducing the rigidity due to the lipid composition of the sperm, which is composed mainly of phospholipids with unsaturated fatty acids. Therefore, the purpose of this project is to evaluate the effect of cholesterol removal may have on the mechanical properties of the sperm, characterized by its elastic modulus (E). We used the scanning ion conductance microscopy in conjunction with a liquid jet production to deform the mice sperm plasma membrane and to calculate its elastic modulus. To remove the cholesterol from the plasma membrane two cholesterol acceptors were used, Methyl- β -cyclodextrin ($M\beta CD$) and Bovine Serum Albumin (BSA). It was observed that sperm exhibit an elevated modulus of elasticity ($E \sim 200\text{kPa}$), which is not altered by the removal of cholesterol from the membrane. Furthermore the thickness of the head of the sperm was measured and used as a control parameter to compare the deformation magnitude with the sperm dimensions of $1\text{-}2\mu\text{m}$. Unexpectedly there was an increase in the thickness of the sperm head, in both the sperm treated with $M\beta CD$ and in the sperm treated with BSA added with NaHCO_3 . The fact that the cells do not change their rigidity with the removal of cholesterol and the increment detected in the thickness of the cell may be due to the increase on the polymerization of actin fibers that occurs during the process of capacitation. It is important to note that the spermatozoa seem to have a very low deformability, this might be because the sperm is a fully differentiated cell, very compact and practically with a small cytoplasm volume, therefore, the plasma membrane could strongly interact with the cytoskeleton, thereby contributing to the relatively high elastic modulus observed in our experiment, compared with those reported for other cell types.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
La fecundación.....	1
El espermatozoide y la espermatogénesis.....	3
Capacitación	5
Membrana plasmática	6
El colesterol en la membrana plasmática	9
La membrana plasmática del espermatozoide	10
Módulo de elasticidad	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPOTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Compuestos usados.....	15
Preparación de los espermatozoides y células espermatogénicas.....	15
Preparación de portaobjetos tratados con PLL	16
Remoción de colesterol y capacitación in vitro	16
Microscopia de barrido por conductancia iónica	17
Adquisición de los datos y análisis.....	19
RESULTADOS	21

Evaluación del efecto de la adhesión al sustrato y análisis del efecto de M β CD sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide.....	21
Análisis del efecto de M β CD y NaHCO ₃ sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide	29
Análisis del efecto de BSA y NaHCO ₃ sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide .	31
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS.....	42
BIBLIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El espermatozoide rumbo a la fecundación.

Se muestra el recorrido de los espermatozoides desde la cavidad cervical externa hasta las trompas de Falopio, específicamente en la ampolla es donde ocurre el encuentro y reconocimiento entre el óvulo y el espermatozoide para la eventual fusión de membranas dándose la fecundación.2

Figura 2. Segmentación del cigoto e implantación.

Durante el recorrido del cigoto por las trompas de Falopio hacia el tracto uterino se llevan a cabo una serie de divisiones celulares, el recorrido completo se realiza en un periodo de 3 a 6 días hasta llegar finalmente a la cavidad uterina2

Figura 3. Proceso de espermatogénesis.

La espermatogénesis tiene lugar en los tubos seminíferos del testículo donde las células espermatogénicas llevan a cabo una serie de divisiones celulares mientras migran hacia la luz del tubo seminífero hasta diferenciarse completamente en espermatozoides.....4

Figura 4. Morfología del espermatozoide de humano y ratón.

En la parte superior observamos al espermatozoide de humano y en la parte inferior al de ratón. La cabeza se encuentra constituida por una vesícula membranosa denominada acrosoma (en amarillo) y el núcleo (en azul) rodeados de la membrana plasmática. En la base de la cabeza se conecta la pieza media es donde se encuentran ubicadas las mitocondrias (en gris) y finalmente se encuentra el flagelo que se divide en pieza principal y pieza final4

Figura 5. Esquema de una membrana plasmática.

(A) Partes constituyentes de la membrana plasmática. (B) Estructuración de la bicapa, donde se observa a los fosfolípidos orientados con su parte hidrofóbica hacia el centro de la bicapa quedando expuestas las cabezas polares hacia el exterior acuoso. (C) Estructura básica de un fosfolípido, el cual consta de una parte polar (hidrofílica) y una no polar (hidrofóbica), la parte polar corresponde a un grupo glicerol unido a un grupo fosfato y a un grupo alcohol mientras que la parte no polar corresponde a cadenas de ácidos grasos, los cuales se pueden presentar en su forma saturada o insaturada.7

Figura 6. Molécula de Colesterol. Diferentes representaciones de la molécula del colesterol.

(A) Estructura molecular, (B) modelo de calotte, (C) modelo de esferas y bastones. El grupo hidroxilo (OH-), en rojo forma la cabeza polar hidrofílica y el cuerpo hidrocarbonado es la región apolar e hidrofóbica.9

Figura 7. Representación esquemática de un material sometido a esfuerzos axiales.....12

Figura 8. Curva Esfuerzo-Deformación.

Representación esquemática de una curva esfuerzo-deformación para un material determinado. Se muestra la región lineal o elástica y la región no lineal o plástica hasta llegar al punto de fractura..... 13

Figura 9. Funcionamiento de un sistema de microscopia de barrido por conductancia iónica (SICM).

Se muestra el diagrama del funcionamiento simplificado de SICM, el sistema fue modificado adicionando un puerto de entrada de presión para la generación del jet de presión..... 17

Figura 10. Esquemas de aplicación de presión en SICM.

En (A) se esquematiza la deformación producida por la aplicación de presión generando un jet de solución. En (B) observamos la posición de control del sistema manteniendo una distancia Z_0 constante entre la punta de la micropipeta y la superficie de la membrana. En (C) se esquematiza la aplicación de presión negativa que permite generar un esfuerzo por succión para producir una deformación de la muestra. 18

Figura 11. Ejemplo de un registro presión y deformación para la construcción de una curva de esfuerzo-deformación.

En (A) observamos un registro completo de la rampa de presión aplicada (trazo azul) a un espermatozoide y su respuesta en deformación (trazo verde). La zona de interés para nuestros experimentos aparece sombreada en amarillo, la parte de la recuperación posterior al estímulo (donde se presenta histéresis) no se utilizó para el análisis de este trabajo; la zona sombreada en azul corresponde a la medición de la altura o grosor de la célula, valor de referencia que utilizamos como control para asegurar que la aplicación de presión fuera realizada sobre la célula. En (B) observamos la curva de esfuerzo-deformación generada a partir del registro en A, mostrando la deformación y el regreso, haciéndose notoria la presencia de histéresis. En (C) se muestra el registro seccionado (área amarilla en A) utilizado para nuestro análisis y (D) la correspondiente curva de esfuerzo-deformación para esa sección del registro..... 19

Figura 12. Ajuste a la curva E-D.

Ejemplo de ajuste obtenido para la curva de esfuerzo-deformación del registro del espermatozoide deformado en la Figura 11D y su correspondiente módulo de elasticidad. 20

Figura 13. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.01% PLL.

En (A) observamos el modulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=52 \pm 8$ kPa y $E=63 \pm 13$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo. 21

Figura 14. Registro de un espermatozoide no adherido.

Registro de una célula estimulada con una serie de pulsos de jet de presión que registraba desplazamientos mayores a las dimensiones del grosor de la cabeza del espermatozoide,

atribuyendo este comportamiento a desplazamientos de la célula completa y no a deformaciones de la superficie de la célula.22

Figura 15. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.1% PLL y tratados con 1mM de M β CD.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=260 \pm 40$ kPa y $E=281 \pm 101$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.....23

Figura 16. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.1% PLL y tratados con 0.5mM de M β CD.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E= 164 \pm 29$ kPa y $E=423 \pm 134$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.....24

Figura 17. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 1mM de M β CD.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=181 \pm 55$ kPa y $E=231 \pm 31$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.....24

Figura 18. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 0.5mM de M β CD.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=191 \pm 35$ kPa y $E=177 \pm 38$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.....25

Figura 19. Porcentaje de células deformadas.

(A) Usando PLL a una concentración del 0.05% como sustrato para la adhesión de los espermatozoides se obtuvo un porcentaje del 20.93% para el grupo control y 47.61% para las células tratadas con 0.5mM de M β CD. (B) Usando PLL a una concentración del 0.05% se obtuvo un porcentaje del 28.93% para el grupo control y 56.09% para las células tratadas con 1mM de M β CD. (C) Usando PLL a una concentración del 0.1% se obtuvo un porcentaje del 60.06% para el grupo control y 29.03% para las células tratadas con 0.5mM de M β CD. (D) Usando PLL a una concentración del 0.1% se obtuvo un porcentaje del 12.19% para el grupo control y 21.95% para las células tratadas con 1mM de M β CD.....26

Figura 20. Módulos de elasticidad obtenidos con los distintos tratamientos de M β CD a dos concentraciones de PLL.

En el caso donde se utilizó una concentración del 0.05% de PLL no existen diferencias significativas para el valor de E para ninguno de los dos tratamientos, 0.5mM y 1mM de M β CD, comparados contra el grupo control, el cual presentó un módulo de elasticidad E \sim 200kPa. Al incrementar la concentración de PLL a 0.1% se observa un incremento en los módulos de elasticidad obtenidos para los espermatozoides tratados con 0.5mM y 1mM M β CD, sin embargo estos resultados no son estadísticamente significativos cuando se comparan con el grupo control. Para 0.05% de PLL se contó con una n=20 para el control, n=20 para 0.5mM M β CD y n=23 para 1mM. Para 0.1% de PLL se contó con una n = 25 para el control, n=8 para 0.5mM M β CD y n=9 para 1mM. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. 27

Figura 21. Comparación entre el grosor de la cabeza los espermatozoides.

Se muestran los promedios en el grosor de los espermatozoides con y sin tratamiento de remoción de colesterol usando diferentes concentraciones de PLL como sustrato de adhesión. Para 0.05% de PLL se conto con una n=38 para el control y n=41 para 1mM. Para 0.1% de PLL se contó con una n=40 para el control y n=41 para 1mM. *P < 0.05. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. 29

Figura 22. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 1mM de M β CD adicionado con 20mM de NaHCO $_3$.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol E=145.17 \pm 30.06 kPa y E=261.13 \pm 47.41 kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo. 30

Figura 23. Porcentaje de células deformadas cuando son tratados con 1mM de M β CD adicionado con 20mM de NaHCO $_3$.

Se obtuvo un porcentaje del 26.19% para el grupo control y 43.90% para las células tratadas con 1mM de M β CD y adicionadas con 20mM de NaHCO $_3$ 30

Figura 24. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con BSA al 0.5% adicionado con 20mM de NaHCO $_3$.

En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol E=227 \pm 23 kPa y E=225 \pm 33 kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de BSA adicionadas con 20mM de NaHCO $_3$. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo. 31

Figura 25. Porcentaje de células deformadas cuando son tratados con BSA al 0.5% y adicionado con 20mM de NaHCO $_3$.

Se obtuvo un porcentaje del 32.14% para el grupo control y 57.14% para las células tratadas con BSA al 0.5% y adicionadas con 20mM de NaHCO₃.32

Figura 26. Comparación de módulos de elasticidad de nuestros grupos experimentales.

Se muestran los promedios de cada uno de los grupos experimentales teniendo para el control E=200 ± 17 kPa (n=49), MβCD E=181 ± 31 kPa (n=23), MβCD+NaHCO₃ E=261 ± 47 kPa (n=18) y BSA+NaHCO₃ E=225 ± 33 kPa (n=32), obteniendo como resultado de la prueba estadística que no existen diferencias significativas en ninguno de ellos en comparación contra el grupo control. Se adicionó un grupo de células espermatogénicas para tener una comparativa con otro tipo celular con propiedades elásticas diferentes. Las barras corresponden al promedio ± error estándar.33

Figura 27. Comparación del grosor de los espermatozoides de nuestros grupos experimentales.

Se muestran los promedios de cada uno de los grupos, para el grupo control A=1.22 ± 0.03 μm (n=136), MβCD - NaHCO₃ A=1.88 ± 0.15 μm (n=41), MβCD + NaHCO₃ A=1.32 ± 0.08 μm (n=41), BSA + NaHCO₃ A=1.51 ± 0.05 μm (n=56). Como resultado de la prueba estadística se obtuvieron diferencias significativas en las células tratadas únicamente con MβCD y las que fueron tratadas con BSA y NaHCO₃ en comparación con el grupo control. Las barras corresponden al promedio ± error estándar. El * denota P < 0.05.....34

Figura 28. Identificación de complejos filipina-colesterol en espermatozoides de ratón.

Microfotografías de transmisión electrónica en muestras de crio-fractura de (A) espermatozoides incubados en medio fisiológico sin BSA o (B) medio fisiológico adicionado con BSA. Los complejos formados entre colesterol y filipina toman estructuras esféricas, observando en (A) una mayor cantidad de estos complejos, localizada principalmente en la región apical de la cabeza, mientras que en (B) se observa una disminución en la cantidad y redistribución de los complejos formados como consecuencia de la remoción de colesterol por BSA. (Figura tomada de Visconti et al. 1999b).....37

Figura 29. Polimerización de actina durante el proceso de capacitación en toro, ratón, humano y carnero.

Imágenes de fluorescencia con tinción específica para actina. Las figuras en la parte superior corresponden a espermatozoides no capacitados de diferentes especies de mamíferos, mostrando una menor intensidad de fluorescencia, mientras que las imágenes de la parte inferior muestran una mayor intensidad de fluorescencia cuando los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes. Denotando que al capacitarse los espermatozoides incrementa la polimerización de actina (Figura tomada de Brener et al. 2002.)38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ácidos grasos saturados y polinsaturados presentes en fosfolípidos de la membrana plasmática de espermatozoides. La proporción de cada tipo de ácido graso se expresa como el porcentaje promedio del total \pm su desviación estándar (modificado de Lenzi et al. 1996). 11

INTRODUCCIÓN

La fecundación

La fecundación es el proceso en el que dos gametos, uno masculino y uno femenino, se fusionan para la creación de un nuevo individuo con una carga genética derivada de ambos progenitores. A todo este proceso se le puede ver como una “una coreografía de alta precisión” (Nixon et al. 2010) (Figura 1) cuyos pasos se pueden generalizar de la siguiente forma:

1. Encuentro y reconocimiento entre el óvulo y el espermatozoide, para asegurar que los gametos sean de la misma especie.
2. Reacción acrosomal y fusión de membranas, en este punto solamente un espermatozoide logrará fecundar al gameto femenino.
3. Una vez fecundado el óvulo, el material genético de ambos gametos se recombina y se da la formación del cigoto y el inicio del desarrollo del embrión.

Dependiendo de la especie, este proceso puede ocurrir en el interior del tracto genital femenino denominándose como fecundación interna (Figura 1) o de forma exterior siendo esta la fecundación externa. Para estudiar los mecanismos que están detrás de este fenómeno, se han utilizado modelos experimentales de diversos organismos, como ratones o erizos de mar los cuales presentan fecundación interna y externa respectivamente (Darzon et al. 2008, Long et al. 2010, Yanagimachi et al. 2013).

En los mamíferos, el proceso de fecundación es interno y ocurre en las trompas de Falopio del aparato genital femenino, específicamente en la ampolla uterina es en donde ocurre el encuentro de los gametos para fusionarse (Figura 1). Una vez fusionados, el cigoto recién formado recorrerá las trompas de Falopio en un periodo de 3 a 6 días hasta llegar a la cavidad del útero (Figura 2). Durante este periodo ocurrirán varios ciclos de división, siendo llamado ahora como blastocito. El blastocito permanecerá 1 a 3 días en el útero hasta finalmente anidarse en el endometrio donde las células trofoblásticas y otras células adyacentes

proliferaran para la formación de la placenta y las distintas membranas de la gestación (Figura 2).

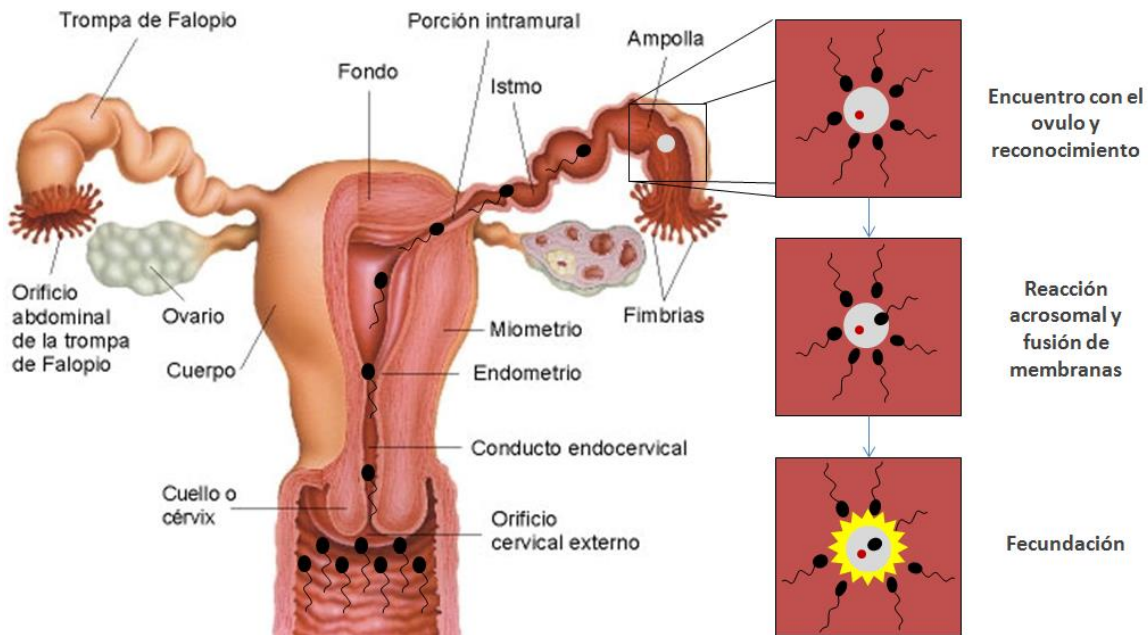


Figura 1. El espermatozoide rumbo a la fecundación. Se muestra el recorrido de los espermatozoides desde la cavidad cervical externa hasta las trompas de Falopio, específicamente en la ampolla es donde ocurre el encuentro y reconocimiento entre el óvulo y el espermatozoide para la eventual fusión de membranas dándose la fecundación.

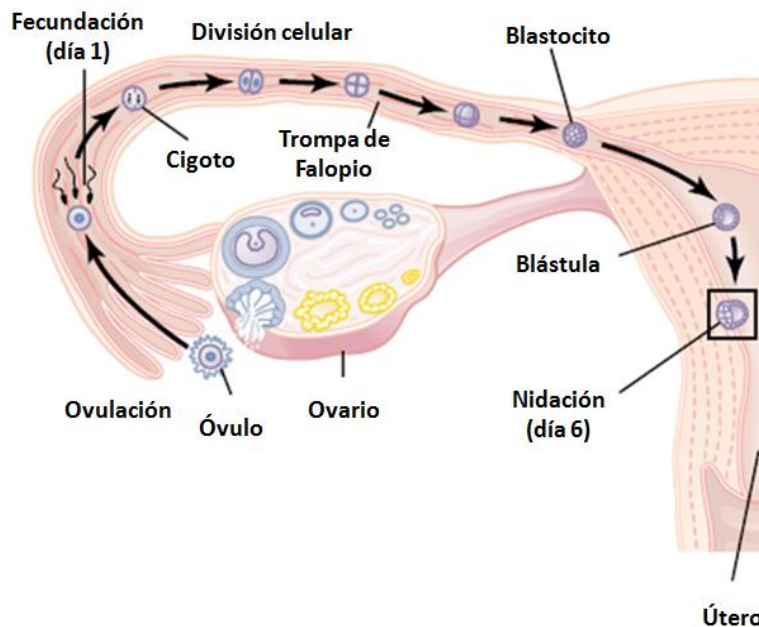


Figura 2. Segmentación del cigoto e implantación. Durante el recorrido del cigoto por las trompas de Falopio hacia el tracto uterino se llevan a cabo una serie de divisiones celulares, el recorrido completo se

realiza en un periodo de 3 a 6 días hasta llegar finalmente a cavidad uterina donde se anidará en el endometrio para la eventual formación del feto (Imagen modificada de Guyton and Hall 2009).

El espermatozoide y la espermatogénesis

El espermatozoide es el gameto masculino, es una célula haploide ya que contiene la mitad de los cromosomas de una célula somática, es mótil y se encuentra completamente diferenciada. Al proceso de diferenciación de los espermatozoides se le conoce como *espermatogénesis*, el cual, en mamíferos tiene lugar en los tubos seminíferos de los testículos a partir de que el organismo alcanza la madurez sexual.

Los espermatozoides se diferencian de las células *espermatogénicas* a través de divisiones celulares secuenciales. Inicia con la migración de las células *espermatogonias* hacia la luz central del túbulo seminífero penetrando a través de las células de Sertoli como se muestra en la Figura 3. Una vez que ha ocurrido esto, las *espermatogonias* se van modificando de forma progresiva aumentando de tamaño para formar los *espermatoцитos primarios*, estos posteriormente se dividen para dar lugar a los *espermatoцитos secundarios*, los cuales al cabo de unos días se dividen formando *espermátidas*, que tras varias modificaciones acaban convirtiéndose en *espermatozoides* (Figura 3).

Durante este proceso, los cromosomas de los espermatoцитos se reparten durante la división meiótica, de manera que al final cada espermátida contiene solo la mitad de los cromosomas.

Morfológicamente el espermatozoide se encuentra estructurado por una cabeza y un flagelo, la cabeza contiene el material genético y una vesícula membranosa denominada *acrosoma*, mientras que el flagelo está constituido por la pieza media y la pieza principal como se muestra en la Figura 4.

La vesícula acrosomal tienen una función similar a la de los lisosomas, conteniendo en ella diversas enzimas como la *hialuronidasa* u otras *enzimas proteolíticas* que ayudan al espermatozoide a atravesar la matriz extracelular del óvulo y fecundarlo al fusionarse las membranas de ambos gametos (Primakoff and Myles 2002, Guyton and Hall 2009).

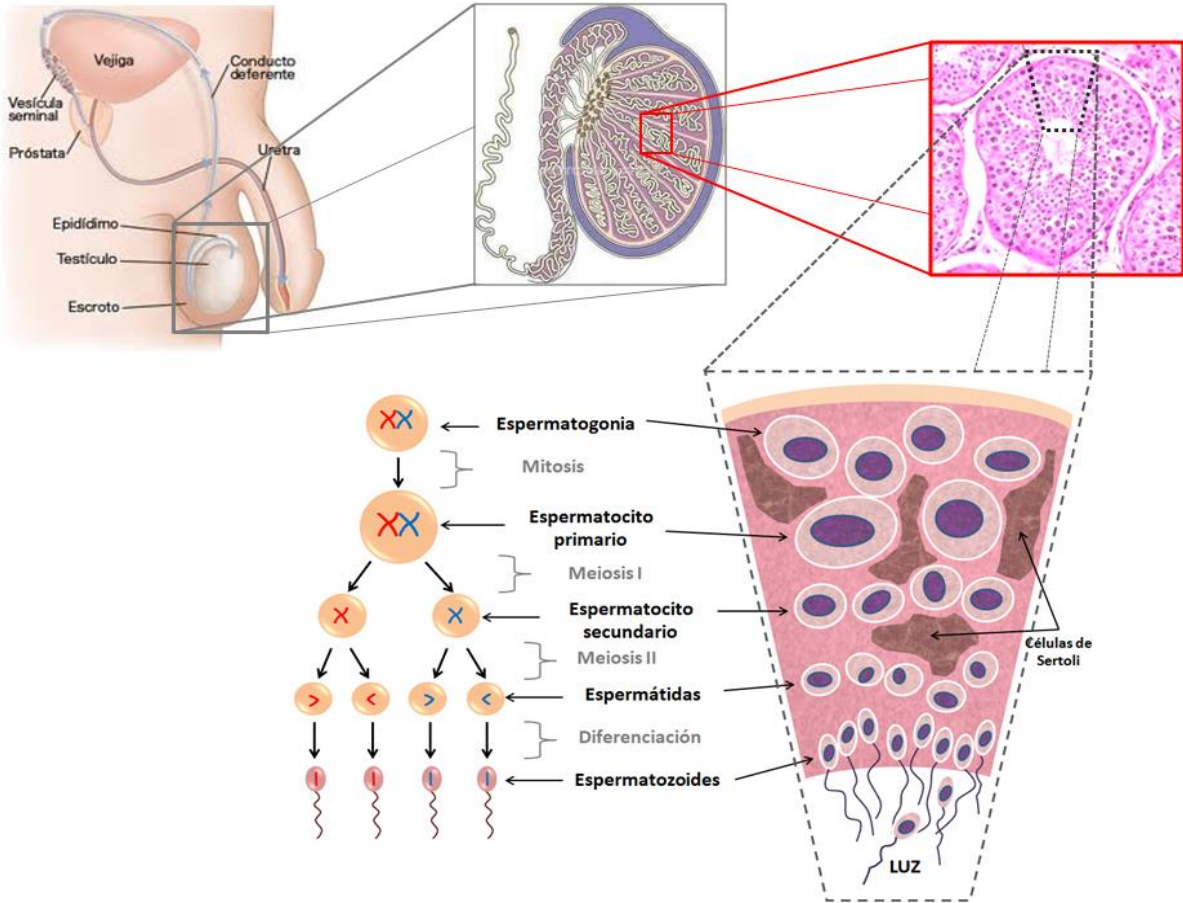


Figura 3. Proceso de espermatogénesis. La espermatogénesis tiene lugar en los tubos seminíferos del testículo donde las células espermatogénicas llevan a cabo una serie de divisiones celulares mientras migran hacia la luz del tubo seminífero hasta diferenciarse completamente en espermatozoides.

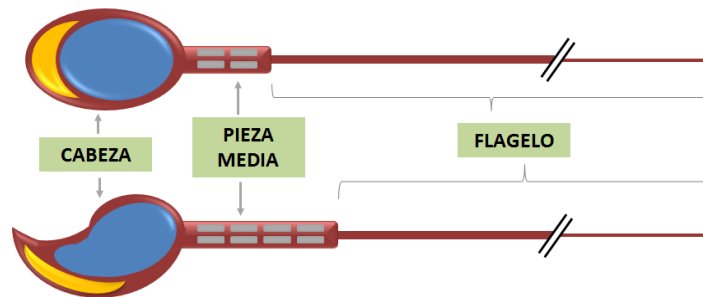


Figura 4. Morfología del espermatozoide de humano y ratón. En la parte superior observamos al espermatozoide de humano y en la parte inferior al de ratón. La cabeza se encuentra constituida por una vesícula membranosa denominada acrosoma (en amarillo) y el núcleo (en azul) rodeados de la membrana plasmática. En la base de la cabeza se conecta la pieza media es donde se encuentran ubicadas las mitocondrias (en gris) y finalmente se encuentra el flagelo que se divide en pieza principal y pieza final

A pesar de que en el testículo los espermatozoides están completamente diferenciados, se dice que los espermatozoides están “maduros” solo hasta que salen del epidídimo. El espermatozoide se mantiene en un estado inactivo, lo cual es controlado por múltiples factores inhibidores secretados por los conductos genitales (Das et al. 2010, Guyton and Hall 2009), de tal forma que cuando son expulsados o eyaculados en el semen son incapaces de fecundar al óvulo, sin embargo, cuando los espermatozoides entran en contacto con la mucosa genital femenina comienzan una serie de cambios fisiológicos que los “activan”. Al conjunto de cambios fisiológicos que preparan al espermatozoide para fecundar al óvulo, se le conoce como “capacitación”.

Capacitación

La capacitación es un proceso post-eyaculatorio al cual se ve sometido el espermatozoide y que le confiere la capacidad de llevar a cabo la tarea de fecundar al óvulo. Algunas de las modificaciones fisiológicas y bioquímicas que se han reportado que suceden durante este proceso son:

- Remoción de colesterol y reordenamiento de los lípidos de la membrana plasmática.
- Incremento del pH intracelular (**pHi**) y de la concentración citoplasmática de calcio ($[Ca^{2+}]_i$).
- Elevación de la concentración de nucleótidos cíclicos.
- Fosforilación de proteínas en Tirosina dependiente de AMPc.
- Hiperpolarización del potencial de membrana.

Dentro de los fenómenos moleculares iniciales se involucra un reordenamiento lipídico en la membrana plasmática, el cual está asociado a cambios en el flujo de iones a través de la membrana y a la activación de cascadas de señalización intracelulares (Miranda et al. 2009). Se sugiere que este reordenamiento lipídico es resultado de la remoción de colesterol de la

membrana plasmática, lo cual se ha propuesto que se traduce en un cambio en la fluidez de la membrana del espermatozoide.

Para comprender mejor las propiedades mecánicas de las membranas biológicas y como se ven afectadas estas con el cambio de su composición, a continuación se describirá brevemente la conformación general de la membrana plasmática y en particular las propiedades del colesterol.

Membrana plasmática

Podemos definir a la membrana plasmática como una barrera que delimita y separa a la célula del medio extracelular, esta se comporta como una barrera selectiva y se encuentra constituida de fosfolípidos, glicolípidos, proteínas y colesterol (este último en el caso de células animales), conformando una estructura de bicapa en la cual los fosfolípidos se organizan a través de interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, exponiendo los grupos que conforman las cabezas polares y por lo tanto hidrofílicas hacia el medio acuoso y manteniendo las colas apolares hacia el interior de la bicapa (Figura 5).

En 1972 Singer y Nicolson desarrollaron el modelo biológico de la membrana plasmática al cual llamaron como “Modelo de Mosaico Fluido”, en el cual se redefine la membrana plasmática con funciones dinámicas, donde está se encuentra en constante difusión lateral, la cual presenta translocación de fosfolípidos y rotación y flexión de las cadenas hidrocarbonadas. Décadas después se describió la existencia de microdominios enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos denominados balsas lipídicas que fungen como sitios de anclaje y agrupamiento para proteínas tanto integrales como periféricas (Simons and Ikonen 1997). Es importante mencionar que la membrana plasmática mantiene una asimetría en su constitución, ya sea por la presencia de moléculas proteicas inmersas en la bicapa así como de los microdominios presentes (Boerke et al. 2008, Harrison and Gadella 2005).

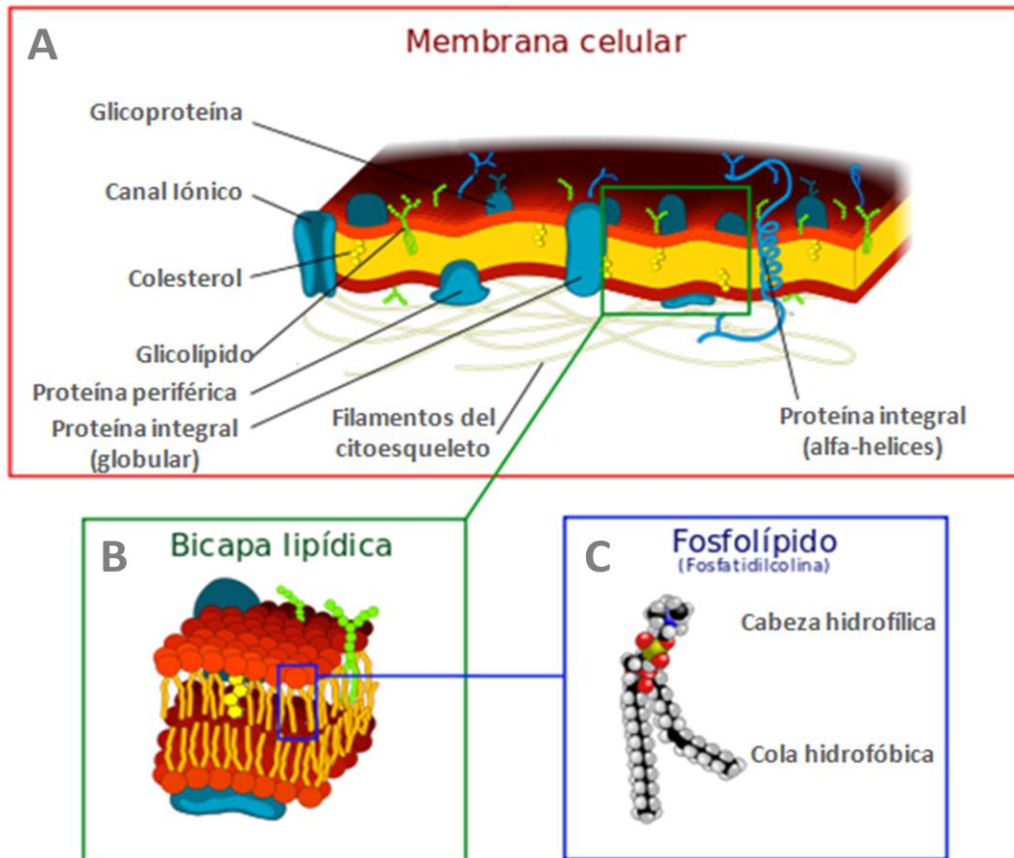


Figura 5. Esquema de una membrana plasmática. (A) Partes constituyentes de la membrana plasmática. (B) Estructuración de la bicapa, donde se observa a los fosfolípidos orientados con su parte hidrofóbica hacia el centro de la bicapa quedando expuestas las cabezas polares hacia el exterior acuoso. (C) Estructura básica de un fosfolípido, el cual consta de una parte polar (hidrofílica) y una no polar (hidrofóbica), la parte polar corresponde a un grupo glicerol unido a un grupo fosfato y a un grupo alcohol mientras que la parte no polar corresponde a cadenas de ácidos grasos, los cuales se pueden presentar en su forma saturada o insaturada.

Sin embargo, la composición lipídica y proteica de la membrana varía entre los diversos tipos celulares, dependiendo del tejido al que pertenezcan y la función que desempeñen, otorgándole propiedades físicas y químicas diversas (Lenzi et al. 1999, Ledesma et al 2012). Por ejemplo, las neuronas poseen un maquinaria molecular específica que les permite regular el movimiento de iones que pasan a través de la membrana plasmática y de esta forma pueden producir cambios en el potencial eléctrico de la célula que se propagan en forma de potenciales de acción; en cambio las células epiteliales de los túbulos renales poseen otro conjunto de moléculas, por lo que no son capaces de generar potenciales de acción pero si de regular la absorción de agua y sales al filtrar la sangre.

La selectividad es una característica importante de las membranas biológicas formadas por lípidos, en particular se refiere al hecho de que su permeabilidad se ve condicionada a moléculas no-polares, por lo que moléculas cargadas o polares no son capaces de permear a través de la membrana por si solas. Sin embargo existen diversas proteínas que permiten el flujo selectivo y controlado de moléculas polares; este grupo de proteínas se conoce genéricamente como transportadores, entre los que se incluyen los portadores y los canales iónicos. De acuerdo a la literatura los portadores unen sus sustratos con una elevada especificidad, catalizan el transporte entre el interior y el exterior celular a velocidades que están por debajo de los límites de la difusión simple y son saturables, esto quiere decir que existe una concentración a la cual alcanza su velocidad de transporte máxima aun cuando la concentración del sustrato siga aumentando. Entre los portadores algunos facilitan la difusión a favor de un gradiente de concentración (transporte pasivo), otros pueden introducir los sustratos en contra de un gradiente de concentración por lo que ocupan energía la cual es proporcionada por una reacción química (transporte activo primario), mientras que otros acoplan el transporte a contra gradiente, aprovechando la fuerza impulsora que genera el gradiente de otra molécula (transporte activo secundario). Por otro lado, los canales iónicos permiten el desplazamiento de iones a través de la membrana a velocidades mayores a los portadores. Estos pueden mostrar diferente especificidad por el ion que transportan y normalmente no son saturables. El transporte iónico se da cuando los canales se abren y permiten el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico. La apertura o activación de los canales puede darse por diferentes estímulos, ya sean cambios en el potencial de membrana de la célula, estímulos químicos (pH, unión de ligandos intracelulares o extracelulares) o por esfuerzos mecánicos (Nelson and Cox 2008).

Otras funciones celulares en las que participa la membrana plasmática y en las que es importante considerar la composición e interacción de lípidos y proteínas son la endocitosis, exocitosis y fusión de membranas, ya que para que la célula sea capaz de realizar estas funciones se ha sugerido que es fundamental el incremento en la fluidez y flexibilidad de la membrana, la cual es dependiente principalmente de su composición lipídica (Lenzi et al. 1996).

El colesterol en la membrana plasmática

El colesterol es una molécula lipídica orgánica, identificada en 1769 por François Poulletier de la Salle, perteneciente al grupo de los esteroides; es un componente estructural esencial de la membrana plasmática de células eucariotas, siendo esta molécula el esteroide de mayor presencia en los tejidos animales. Es una molécula anfipática con una cabeza polar constituido por un grupo hidroxilo y un cuerpo no polar hidrocarbonado (Figura 6), estas características le confieren funciones diversas, ya sea como constituyente estructural y estabilizador de la membrana plasmática (Boerke et al. 2008) o como precursor de hormonas esteroideas (Hanukoglu 1992, Peter and Dubuis 2000, Payne and Hales 2004).

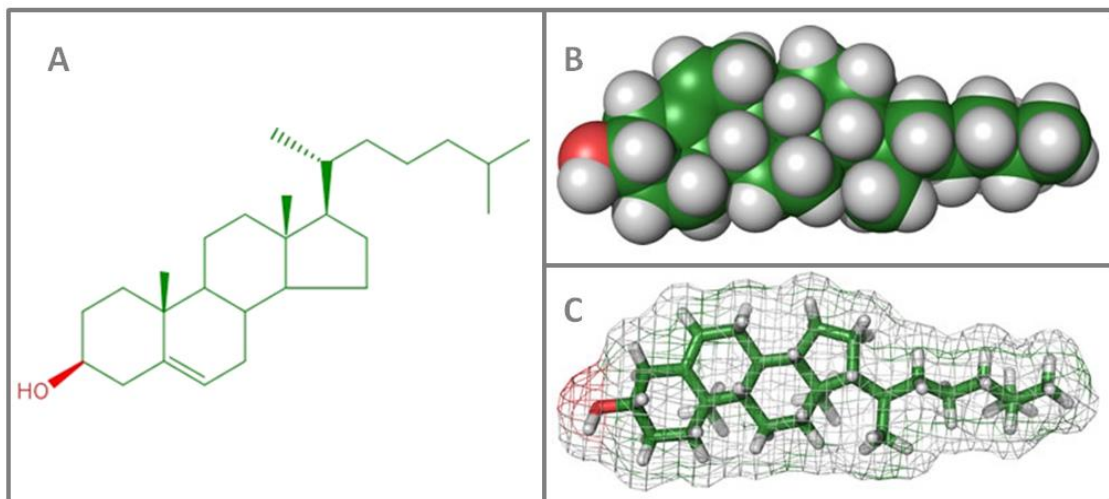


Figura 6. Molécula de Colesterol. Diferentes representaciones de la molécula del colesterol. (A) Estructura molecular, (B) modelo calotte, (C) modelo de esferas y bastones. El grupo hidroxilo (OH-), en rojo forma la cabeza polar hidrofílica y el cuerpo hidrocarbonado es la región apolar e hidrofóbica.

El colesterol ha sido implicado en la modulación de la fluidez de la membrana y en la formación de balsas lipídicas, debido a que su grupo hidroxilo interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana mientras que la cadena hidrocarbonada se encuentra inmersa en la membrana junto a las cadenas no polares de los ácidos grasos de los fosfolípidos logrando con esto estabilizar la membrana (Boerke et al. 2008). Sin embargo, también se debe considerar el grado de saturación de la cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que conforman la parte no polar de los fosfolípidos; estructuralmente una membrana con fosfolípidos cuyas colas están formadas por ácidos grasos saturados es más compacta, ya que las cadenas de ácidos

grasos se ordenan lateralmente sin dejar espacios entre ellos, por lo que al incorporar moléculas de colesterol entre los fosfolípidos, se abrirían los espacios intramoleculares entre fosfolípidos, que harían la membrana sea más laxa. En cambio, en una membrana con fosfolípidos cuyas colas están conformadas por ácidos grasos insaturados, donde los dobles enlaces de las insaturaciones producen dobleces en la estructura lineal de la cadena hidrocarbonada, lo que hace que los organización de los fosfolípidos sea menos compacta al existir una mayor distancia entre los fosfolípidos, por lo que la adición de moléculas de colesterol entre este tipo de fosfolípidos estabilizaría la membrana al ocupar los espacios existentes debido a las insaturaciones de los ácidos grasos (Orädd et al. 2002, Boerke et al. 2008, Tapia et al. 2012).

Otra de las funciones estructurales del colesterol es la reducción en la permeabilidad en la membrana plasmática a solutos neutros, protones y iones de sodio (Yeagle 1991).

La membrana plasmática del espermatozoide

En general, la membrana plasmática del espermatozoide contiene aproximadamente 70% de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros (colesterol, colesterol sulfato, ésteres de colesterol y cantidades bajas de desmosterol) y 5% de glicolípidos (Flesh and Gadella 2000).

Para comprender mejor como se pueden ver afectadas las propiedades mecánicas de la membrana plasmática debido a su composición, es importante observar la proporción de los diferentes tipos de fosfolípidos que la conforman, en la Tabla 1 se puede observar las proporciones de los diferentes tipos de ácidos grasos poli-insaturados que se encuentran en los fosfolípidos de la membrana plasmática de espermatozoides, destacando que los ácidos grasos encontrados más frecuentemente son el ácido docosahexanoico (C22:6 n-3) en espermatozoides de cerdo y humano (Cerolini et al. 2000, Khosrowbeygi and Zarghami 2007) y el ácido docosapentanoico (C22:5 n-6) en espermatozoides de caballo (Garcia et al. 2011), los cuales presentan un alto número de insaturaciones, característica que como se mencionó anteriormente, le confiere mayor fluidez a la membrana y podría estar directamente relacionado con una mayor elasticidad (Tapia et al. 2012, Lenzi et al. 1999).

Tabla 1. Ácidos grasos saturados y polinsaturados presentes en fosfolípidos de la membrana plasmática de espermatozoides. La proporción de cada tipo de ácido graso se expresa como el porcentaje promedio del total \pm su desviación estándar (modificado de Lenzi et al. 1996).

<i>Origen de las membranas</i>	<i>C16:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C20:3</i>	<i>C20:4</i>	<i>C22:6</i>	<i>Otros ácidos grasos</i>
<i>Muestra completa de espermatozoides</i>	31.5 \pm 3.6	13.5 \pm 2.1	18.5 \pm 2.5	8.5 \pm 2.2	0.21 \pm 0.1	5.5 \pm 1.2	22.5 \pm 3.2	2.2 \pm 0.5
<i>Muestra de espermatozoides separados por gradientes de Percoll</i>	25.6 \pm 4	9.4 \pm 2.2	10.5 \pm 1.6	6.5 \pm 1.2	0.32 \pm 0.1	10.5 \pm 1.5	34.5 \pm 4.2	2.8 \pm 0.4

Como se mencionó anteriormente, durante la capacitación se produce una remoción de colesterol y se observa un reordenamiento de los lípidos de la membrana plasmática (Flesch et al. 2001, Harrison and Gadella 2005, Boerke et al. 2008). Se ha propuesto que un decremento en la rigidez de la membrana permite que se lleve a cabo una redistribución de proteínas y lípidos hacia otros dominios presentes en la cabeza del espermatozoide favoreciendo la reacción acrosomal (RA) y la fusión de membranas entre el espermatozoide y el óvulo (Flesch and Gadella 2000). Está reportado que proteínas como caveolina y flotilina, involucradas en RA, migran de la membrana sobre el acrosoma hacia la zona apical (Boerke et al. 2008).

La remoción de moléculas de colesterol de la membrana del espermatozoide durante la capacitación *in vitro* es dependiente de la presencia de albúmina en el medio extracelular, sin embargo, la sola presencia de albúmina no es suficiente para capacitar al espermatozoide, además es necesaria la adición de HCO_3^- y Ca^{2+} en el medio de incubación para que este proceso se lleve a cabo (Visconti et al. 1995).

Existen otras moléculas que funcionan como aceptoras de colesterol, como la lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y la metil- β -ciclodextrina (M β CD), esta última presenta una mayor eficiencia en la remoción del colesterol de la membrana plasmática, incrementando la solubilidad de sustancias no polares al incorporarlas en su cavidad hidrofóbica formando complejos de inclusión (Iborra et al. 2000). Es importante destacar que esta molécula puede capacitar al espermatozoide aun en la ausencia de HCO_3^- , aunado a esto se encuentra reportado que la M β CD remueve en mayor proporción el colesterol de la membrana, hasta en un 60% (Iborra et al. 2000), comparada con la albúmina, que únicamente logra

remover un 20% (Boerke et al. 2008), sin embargo, la activación de las vías de señalización intracelular que participan en la capacitación se produce aun con niveles bajos de remoción de colesterol (Iborra et al. 2000).

Módulo de elasticidad

Es de interés para este trabajo el poder determinar las propiedades mecánicas de la célula, en específico la fluidez y por tanto la elasticidad de su membrana plasmática. El módulo de elasticidad es un parámetro que caracteriza el comportamiento elástico de un material. Está definido como la razón del esfuerzo a lo largo del eje axial sobre la deformación axial del material.

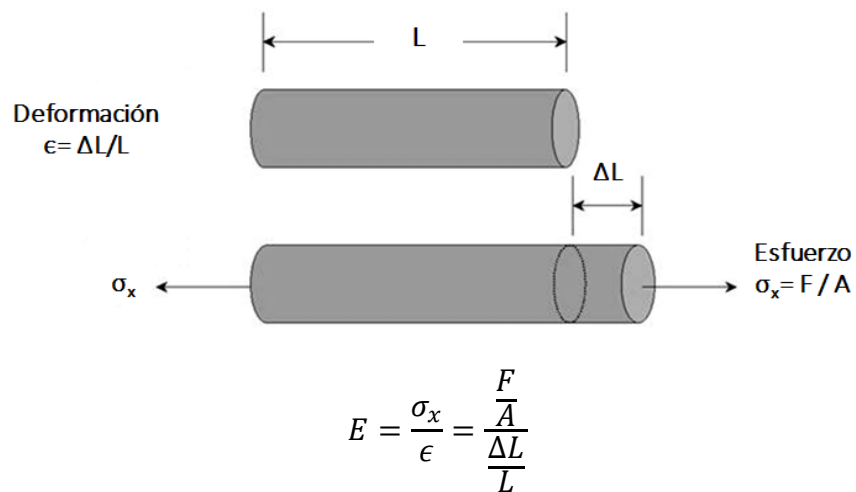


Figura 7. Representación esquemática de un material sometido a esfuerzos axiales.

Lo podemos observar en la Figura 8, donde E es el módulo de elasticidad longitudinal, σ_x es la presión ejercida sobre el área de sección transversal del objeto la cual también se puede expresar en términos de fuerza aplicada (F) sobre área transversal del material (A) y ϵ es la deformación unitaria en cualquier punto de la barra que de igual forma se puede expresar como el cociente de la deformación producida (ΔL) entre la longitud inicial del material (L).

El módulo de elasticidad puede ser determinado a partir de la pendiente de la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación generada a partir de un ensayo de tensión de una muestra del

material de interés (Figura 8). De tal forma que un material muy rígido tendrá como característica un módulo de elasticidad muy elevado y viceversa.

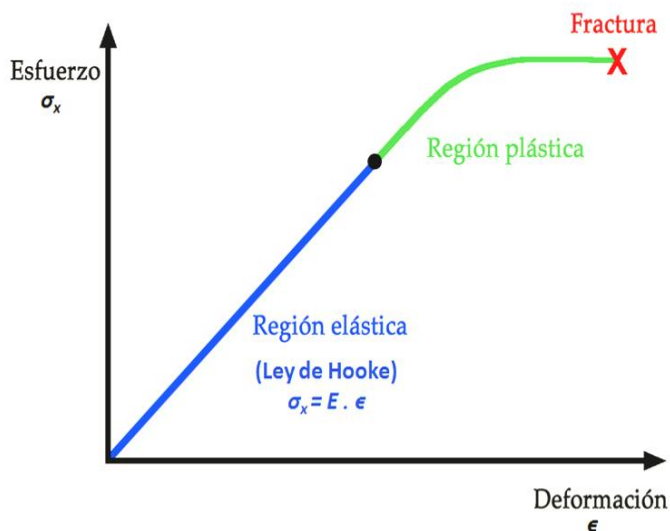


Figura 8. Curva Esfuerzo-Deformación. Representación esquemática de una curva esfuerzo-deformación para un material determinado. Se muestra la región lineal o elástica y la región no lineal o plástica hasta llegar al punto de fractura.

El módulo de elasticidad también es conocido como módulo de Young en honor al científico inglés Tomas Young quien fue el primero en estudiar este fenómeno. Se mide en unidades de presión, de acuerdo al sistema internacional de unidades (SI) la unidad de medida es el Pascal (Pa) o su equivalente en Newtons por metro cuadrado (N/m^2).

También representa el factor de proporcionalidad de la ley de Hooke que relaciona el esfuerzo y la deformación. Sin embargo, esta ley solo es válida bajo la suposición de un material elástico o de respuesta lineal. Cualquier material eventualmente fallará y se romperá cuando sea sometido a un sobreesfuerzo ya sea por fuerzas o deformaciones elevadas. De cualquier modo, todos los materiales obedecen la ley de Hooke para esfuerzos o deformaciones lo suficientemente pequeños. De tal forma que si el rango de deformación en donde es válida la ley de Hooke es lo suficientemente grande comparado con el esfuerzo que esperamos aplicar al material, entonces podemos decir que el material presenta una elasticidad lineal, de otra forma el material es considerado no lineal (Serway and Beichner 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se puede observar, la remoción del colesterol es un paso determinante para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fecundar al óvulo, sin embargo se desconoce el efecto que produce la salida del colesterol de la membrana en las propiedades mecánicas de esta, en específico la elasticidad y la fluidez, información que sería útil para tratar de explicar si estos cambios físicos son suficientes para activar alguna molécula que inicie la cascada de señalización intracelular.

HIPOTESIS

La remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide de ratón producida por la presencia de moléculas aceptoras de colesterol disminuirá la rigidez de la membrana debido a que la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide se encuentra mayormente compuesta por fosfolípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar los cambios en la rigidez de la membrana de espermatozoide de ratón inducidos por la remoción de colesterol.

Objetivos particulares

- Obtener los módulos de elasticidad de la membrana plasmática de espermatozoide de ratón en presencia de medio fisiológico adicionado con Metil- β -Ciclodestrina (M β CD).
- Obtener los módulos de elasticidad de la membrana plasmática de espermatozoide de ratón, en presencia de medio fisiológico adicionado con Albúmina (BSA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos usados

En la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes compuestos y sales: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio (Mg_2SO_4), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$), piruvato de sodio ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$) y HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), metil- β -ciclodextrina (M β CD), albúmina de suero bovino (BSA), poli-L-lisina (PLL).

Preparación de los espermatozoides y células espermatogénicas

Los espermatozoides y células espermatogénicas se obtuvieron de ratones blancos de la cepa CD1 maduros sexualmente. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se disecaron los epidídimos y los testículos.

Para obtener los espermatozoides, la parte caudal del epidídimo fue macerada en 1.5ml de medio Whitten-Hepes (WH), el cual contiene (en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgSO_4 , 10 glucosa, 1 piruvato de sodio y 10 HEPES a pH 7.3, esta solución fue utilizada como medio fisiológico no capacitante ya que no contiene BSA ni HCO_3^- . Se dejó reposar la mezcla al menos 30 minutos y se colectó el sobrenadante de la solución el cual contiene los espermatozoides, en este tiempo los espermatozoides móviles nadan al exterior de los restos del epidídimo permaneciendo suspendidos en el medio, a este procedimiento se le conoce como método de “swim-up” o “nado hacia arriba” y permite coleccionar los espermatozoides que presentan una mayor motilidad (Cisneros y Sánchez 2011).

Para obtener las células espermatogénicas, se removió la túnica albugínea de los testículos y se tomó una muestra de túbulos seminíferos, los cuales fueron disgregados mecánicamente, cortándolos en pequeños pedazos con tijeras de disección, en 1.5ml de medio WH. Se dejó reposar la mezcla por 30 segundos y se tomó una muestra del sobrenadante, el cual contiene a las células espermatogénicas.

Preparación de portaobjetos tratados con PLL

Se prepararon 3 diluciones de PLL, al 0.01%, 0.5% y 0.1% para tratar los portaobjetos, esto con el objeto de adherir los espermatozoides y poder realizar las mediciones de deformación, los portaobjetos se dejaron reposar en la solución de PLL durante toda la noche y se dejaron secar a temperatura ambiente por al menos 3 horas antes de usarlos.

Remoción de colesterol y capacitación *in vitro*

La remoción de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides se puede llevar a cabo *in vitro* empleando dos estrategias, la primera es adicionando metil- β -ciclodextrina (M β CD) al medio de incubación de los espermatozoides en una concentración de 1mM (Visconti et al. 1999a), de acuerdo a lo reportado esta molécula es más potente para remover colesterol aun en ausencia de NaHCO₃, no obstante, requiere de NaHCO₃ en el medio para llevar a un estado capacitado a las células (Visconti et al. 1999a). La segunda es mediante el tratamiento de los espermatozoides con albúmina de suero bovino (BSA), que es adicionada al medio WH. De acuerdo a reportes es necesario estar en una concentración de 0.5% para la albúmina con bicarbonato en un rango entre 10 y 30mM para (Visconti et al. 1995), en nuestros experimentos la concentración usada de NaHCO₃ fue de 20mM. Tomando en cuenta estas consideraciones se formaron los siguientes grupos experimentales:

1. Espermatozoides control (sin tratamiento).
2. Espermatozoides tratados únicamente con M β CD.
3. Espermatozoides tratados con M β CD y adicionados con NaHCO₃ (condición capacitante).
4. Espermatozoides tratados con BSA y adicionados con NaHCO₃ (condición capacitante).

Cada uno de los grupos experimentales fueron incubados por al menos una hora a 37°C en un ambiente controlado con CO₂ al 5%. Una vez concluido el tiempo de incubación, se colocan 50 μ l de muestra sobre un portaobjetos de vidrio de nuestra cámara de registro, previamente tratado con Poli-L-lisina (PLL), la muestra se deja reposar durante un periodo de 15 minutos esto con el objetivo de que los espermatozoides se adhieran al vidrio y se pueda realizar las mediciones.

Concluido este tiempo se realiza un lavado para remover los espermatozoides no adheridos y detener la remoción de colesterol.

Microscopia de barrido por conductancia iónica

La caracterización de los módulos de elasticidad de la membrana plasmática de los espermatozoides se realizó utilizando un Microscopio de Barrido por Conductancia Iónica (SICM, por sus siglas en ingles). El sistema utiliza una micropipeta de vidrio como sensor, la cual está llena de una solución salina y contiene un electrodo de Ag/AgCl, un sistema de control se encuentra monitoreando continuamente el flujo de corriente eléctrica a través de la punta de la micropipeta, utilizando cualquier cambio en la corriente para retroalimentar al equipo, se sabe que cambios ocurridos en el flujo de corriente corresponden a cambios en la distancia de separación entre la superficie de la célula y la punta de la micropipeta, respondiendo el sistema con desplazamiento de la micropipeta (contracción o extensión) permitiendo mantener siempre una distancia constante entre la punta de la micropipeta y la superficie de la muestra (Figura 9).

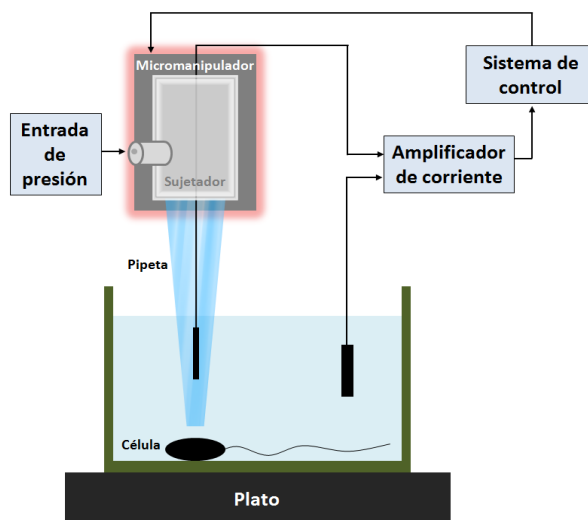


Figura 9. Funcionamiento de un sistema de microscopia de barrido por conductancia iónica (SICM). Se muestra el diagrama del funcionamiento simplificado de SICM, el sistema fue modificado adicionando un puerto de entrada de presión para la generación del jet de presión.

Esta técnica permite realizar experimentos de esfuerzo-deformación en escala nanométrica, a partir de la deformación producida en la muestra por un *jet* de líquido a presión aplicado sobre la superficie y generado por medio de la misma micropipeta que se utiliza como sensor del SICM, el cual mantiene siempre una distancia constante entre la punta de la micropipeta y la superficie de la muestra, lo que permite conocer tanto la magnitud del esfuerzo como de la deformación. Esta técnica permite realizar mediciones bajo 2 esquemas de aplicación de presión positiva y negativa como se muestra en la Figura 10.

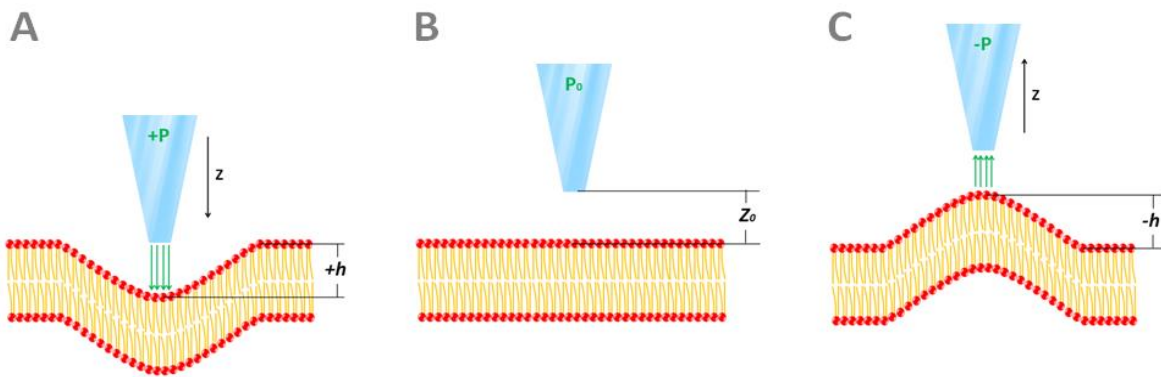


Figura 10. Esquemas de aplicación de presión en SICM. En (A) se esquematiza la deformación producida por la aplicación de presión generando un jet de solución. En (B) observamos la posición de control del sistema manteniendo una distancia Z_0 constante entre la punta de la micropipeta y la superficie de la membrana. En (C) se esquematiza la aplicación de presión negativa que permite generar un esfuerzo por succión para producir una deformación de la muestra.

Conociendo la presión aplicada sobre la membrana y el desplazamiento de la superficie de la muestra en respuesta a esta presión (curva esfuerzo-deformación), se puede calcular el módulo de elasticidad (Modulo de Young) para este sistema a partir de la siguiente expresión:

$$E = \frac{16(1 - \nu^2) r_i \Delta P}{3\pi h}$$

Donde ν es la constante de Poisson, E el modulo de Young, r_i es el radio interno de la pipeta, ΔP es la presión aplicada y h es la distancia que se desplazó la punta de la micropipeta. Se asume $\nu=0.5$ para un material incompresible y poco deformable (Sánchez et al, 2008).

Adquisición de los datos y análisis

Las mediciones se realizaron en la parte media de la cabeza del espermatozoide debido a que tiene una mayor superficie y a que presenta una morfología aplanada. Los registros de presión y deformación se obtuvieron con el software de adquisición y digitalización de registros electrofisiológicos PClamp10 de Axon Instruments, a una frecuencia de muestreo de 10kHz. De los registros obtenidos, se analizó la deformación producida por la aplicación del estímulo de presión como se ilustra en la Figura 11. A partir de estos registros se construyeron las curvas de esfuerzo-deformación ajustando la parte lineal a partir de la cual es posible realizar el cálculo de los módulos de elasticidad.

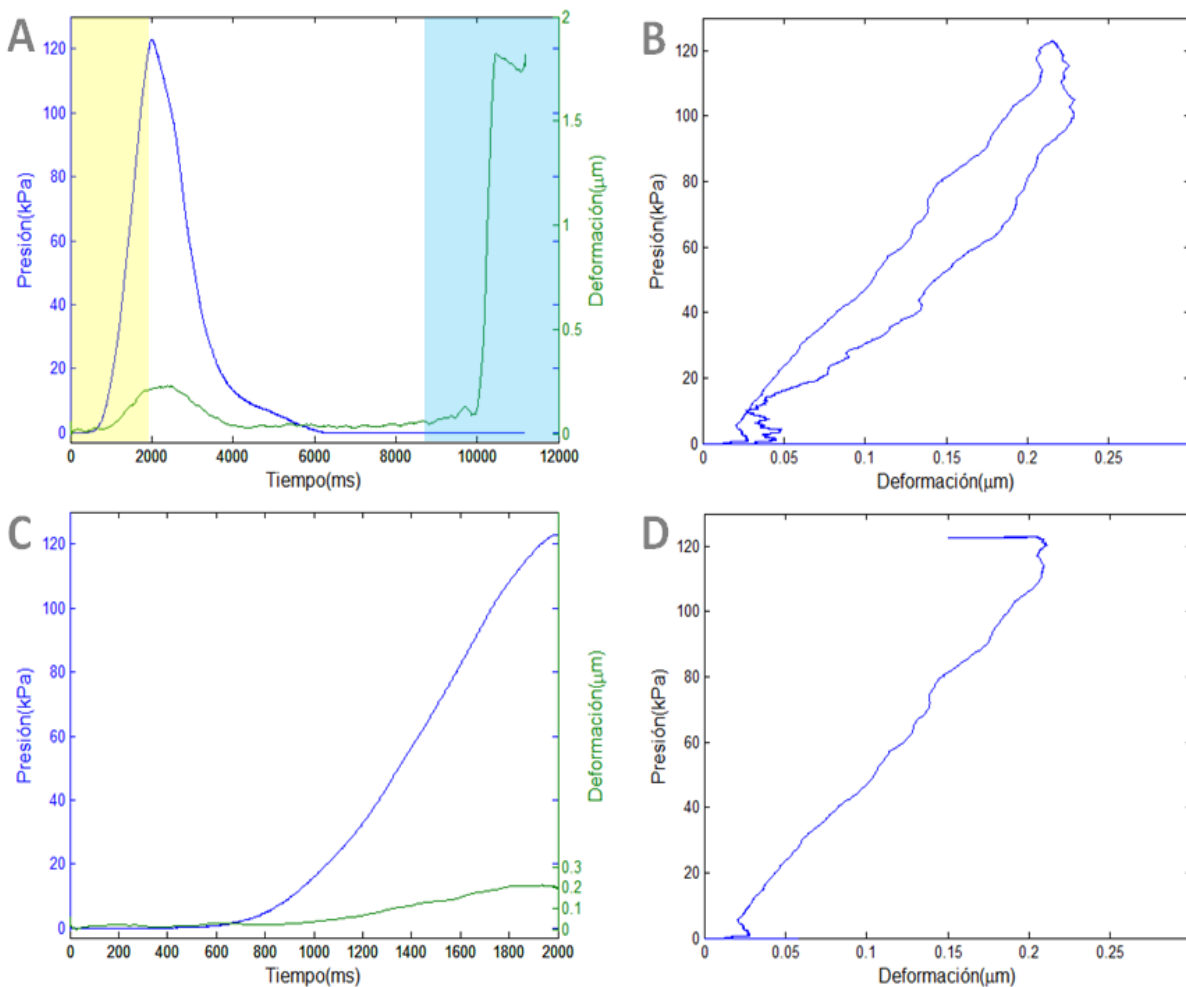


Figura 11. Ejemplo de un registro presión y deformación para la construcción de una curva de esfuerzo-deformación. En (A) observamos un registro completo de la rampa de presión aplicada (trazo azul) a un espermatozoide y su respuesta en deformación (trazo verde). La zona de interés para nuestros

experimentos aparece sombreada en amarillo, la parte de la recuperación posterior al estímulo (donde se presenta histéresis) no se utilizó para el análisis de este trabajo; la zona sombreada en azul corresponde a la medición de la altura o grosor de la célula, valor de referencia que utilizamos como control para asegurar que la aplicación de presión fuera realizada sobre la célula. En (B) observamos la curva de esfuerzo-deformación generada a partir del registro en A, mostrando la deformación y el regreso, haciéndose notoria la presencia de histéresis. En (C) se muestra el registro seccionado (área amarilla en A) utilizado para nuestro análisis y (D) la correspondiente curva de esfuerzo-deformación para esa sección del registro.

A partir de la curva de esfuerzo-deformación (E-D) obtenida se realiza un ajuste a la parte lineal de la curva (Figura 12) para determinar la pendiente de ésta, el valor de la pendiente calculado se utiliza para el cálculo del módulo de elasticidad.

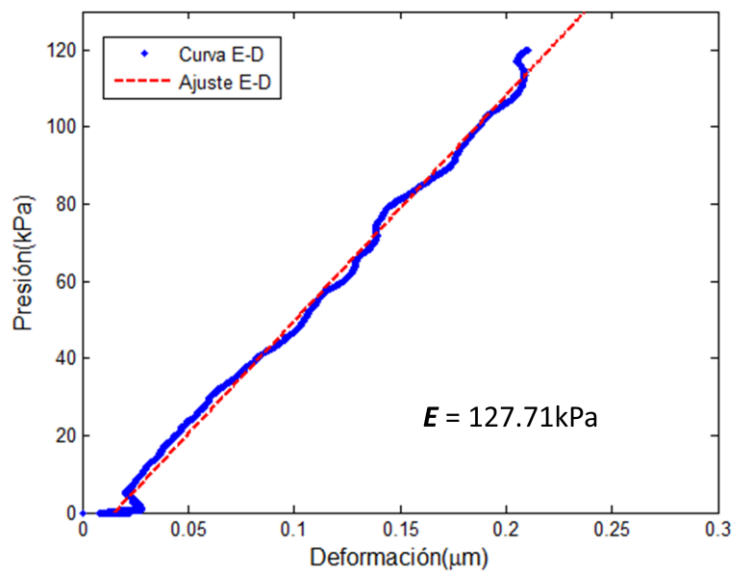


Figura 12. Ajuste a la curva E-D. Ejemplo de ajuste obtenido para la curva de esfuerzo-deformación del registro del espermatozoide deformado en la Figura 11D y su correspondiente módulo de elasticidad.

Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante una prueba ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales tomando un valor de significancia de $*P < 0.05$. Los valores reportados para **E** corresponden al promedio calculado \pm el error estándar.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de la adhesión al sustrato y análisis del efecto de M β CD sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide

Como parte del proceso de estandarización de las condiciones experimentales para poder realizar una medición óptima, era necesario que los espermatozoides estuvieran bien adheridos al fondo de la cámara de registro, por lo cual se evaluaron 3 diferentes concentraciones de Poli-L-lisina (PLL) para tratar los portaobjetos de la cámara de registro y así determinar en cuál de ellas era posible realizar los experimentos de esfuerzo-deformación.

Inicialmente, se utilizó una concentración de PLL al 0.01%, esta concentración es la utilizada en nuestro laboratorio como sustrato para adherir las células al portaobjetos para realizar mediciones electrofisiológicas con la técnica de *patch-clamp*, y se procedió a determinar los módulos de elasticidad tanto para los espermatozoides control (no tratados) como para los tratados con 1mM de M β CD (Figura 13), obteniéndose un modulo promedio para el control de $E=52 \pm 8$ kPa y $E=63 \pm 13$ kPa para los espermatozoides tratados con 1mM de M β CD.

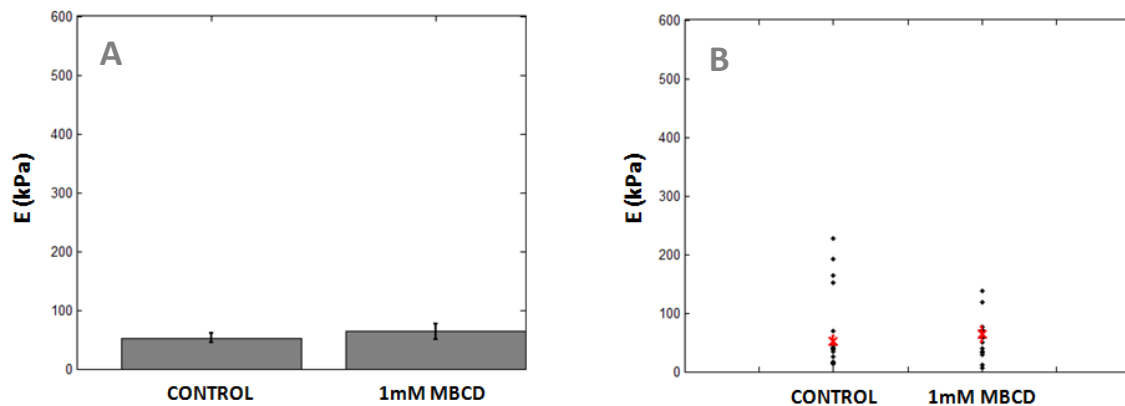


Figura 13. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.01% PLL. En (A) observamos el modulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=52 \pm 8$ kPa y $E=63 \pm 13$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Sin embargo, en estos experimentos se pudo observar que con esta concentración de PLL, los espermatozoides no se adherían correctamente al vidrio, ya que al realizar el lavado de la muestra quedaban muy pocos espermatozoides adheridos al vidrio y, de los que se lograban “adherir”, algunos se sujetaban parcialmente de la cabeza y se mantenían móviles lo que ocasionaba que los flagelos se pegaran a la micropipeta haciendo imposibles los registros, otros presentaban artefactos donde las “deformaciones” en respuesta a la fuerza aplicada era de magnitudes mayores a las del grosor de la célula, proporcionando registros erróneos.

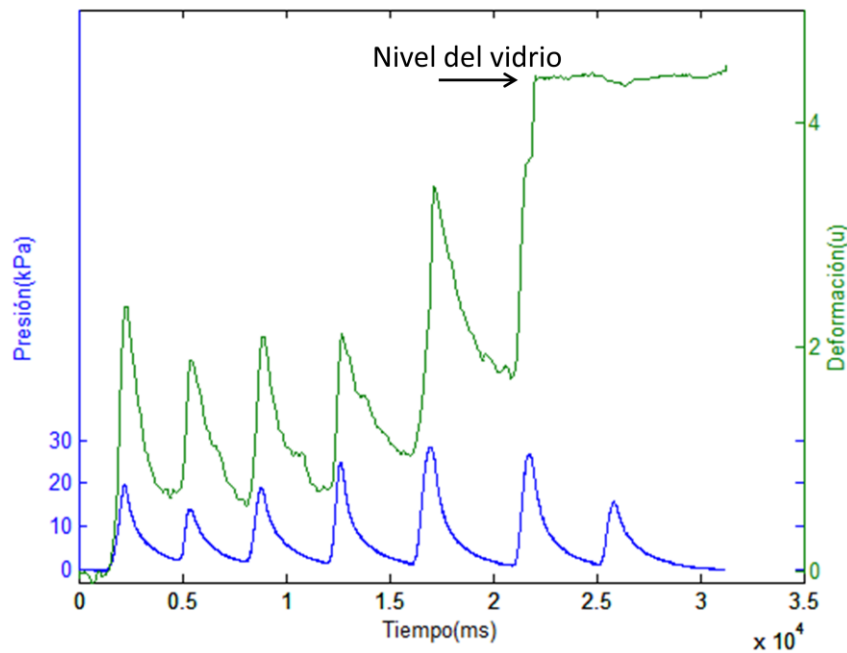


Figura 14. Registro de un espermatozoide no adherido. Registro de una célula estimulada con una serie de pulsos de jet de presión que registraba desplazamientos mayores a las dimensiones del grosor de la cabeza del espermatozoide, atribuyendo este comportamiento a desplazamientos de la célula completa y no a deformaciones de la superficie de la célula.

En la Figura 14 se muestra un trazo ilustrativo del registro de la presión aplicada para generar el *jet* de líquido (trazo azul) y del desplazamiento del sensor siguiendo el movimiento en respuesta el estímulo correspondiente (trazo en verde), para una célula no adherida al vidrio (flotante), en donde se puede observar que los desplazamientos en respuesta a la aplicación del estímulo no corresponden a los esperados para una célula de dimensiones entre 1 y 2 μm de grosor, indicando que la célula de hecho estaba flotando, por lo que cada vez que se aplicaba un *jet* de

presión esta se desplazaba completamente, hasta llegar al séptimo pulso de presión donde no se observa ningún desplazamiento, esto debido a que la punta de la pipeta dejó de estar sobre la superficie de la célula y cayó al nivel del vidrio.

Con la finalidad de obtener una mejor adhesión de los espermatozoides al vidrio, se incrementó la concentración de PLL, utilizando dos diferentes concentraciones: 0.05% y 0.1% (Huang et al. 1983), para ambas concentraciones se observó que los espermatozoides presentaron una mejor adhesión, al no detectarse movimientos inesperados de las células y obtener deformaciones en el rango de magnitud esperado ($\sim 1-2 \mu\text{m}$). Esto nos permitió probar el efecto de la remoción de colesterol, al incubar los espermatozoides con 1mM ó 0.5mM de M β CD; ambas concentraciones han sido utilizadas en otros reportes en condiciones capacitantes (Visconti et al. 1999a).

Cuando las células fueron adheridas a la cámara utilizando 0.1% de PLL, se calculó el módulo de elasticidad promedio para las células control de $E = 260 \pm 40 \text{ kPa}$ y $E=281 \pm 101 \text{ kPa}$ para las células tratadas con 1mM M β CD (Figura 15).

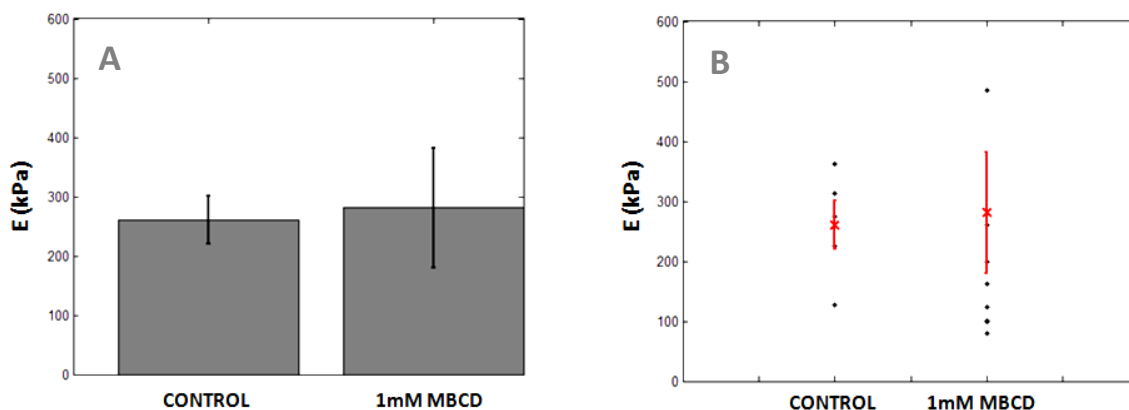


Figura 15. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.1% PLL y tratados con 1mM de M β CD. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=260 \pm 40 \text{ kPa}$ y $E=281 \pm 101 \text{ kPa}$ para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Por otro lado cuando se utilizó una concentración menor de M β CD (0.5mM) observamos un aparente incremento en el módulo de elasticidad para los espermatozoides tratados de $E= 423 \pm 134 \text{ kPa}$ mientras que el control presentó un módulo de $E= 164 \pm 29 \text{ kPa}$ (Figura 16).

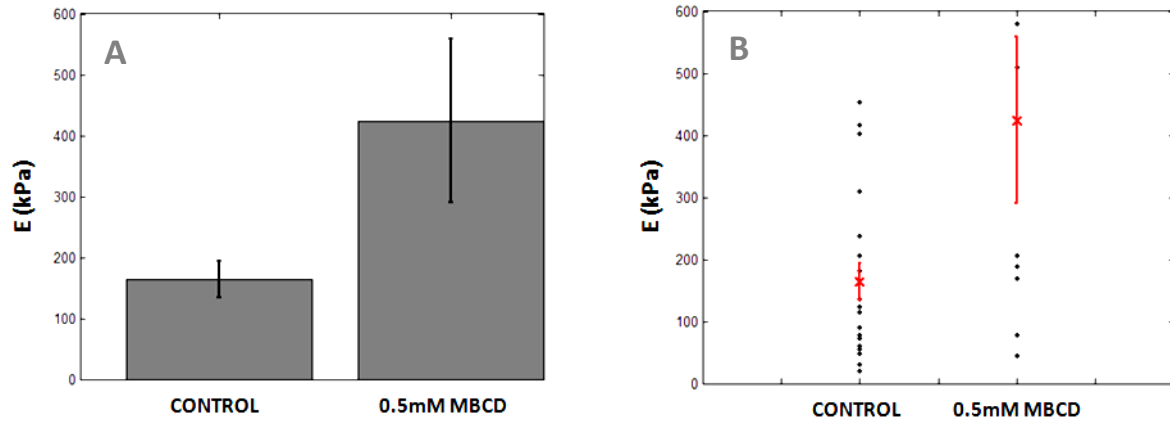


Figura 16. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.1% PLL y tratados con 0.5mM de M β CD. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E= 164 \pm 29$ kPa y $E=423 \pm 134$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Así mismo, se evaluó el utilizar una concentración intermedia de PLL (0.05%) para adherir las células y se obtuvo que, para los espermatozoides tratados con 1mM M β CD el módulo de elasticidad promedio fue de $E=181 \pm 55$ kPa y $E=231 \pm 31$ kPa para los no tratados, como observamos en la Figura 17.

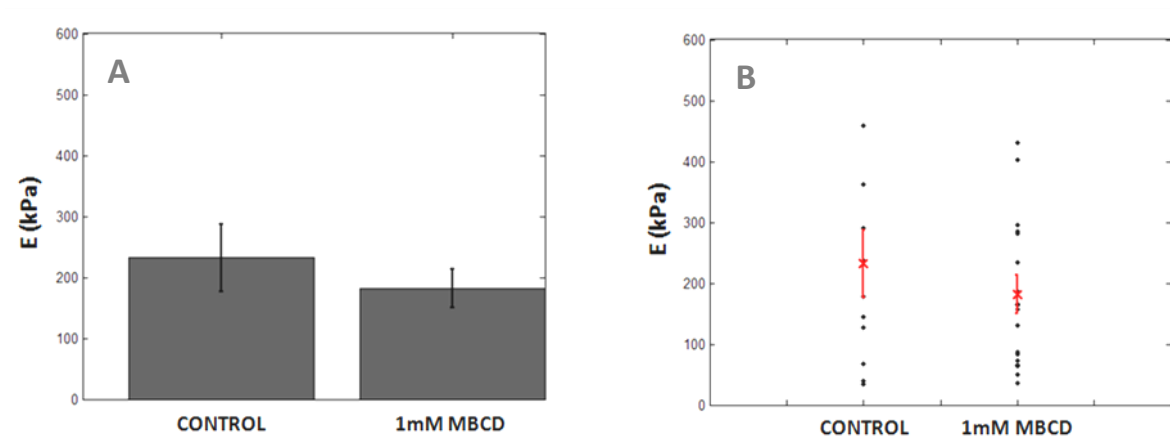


Figura 17. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 1mM de M β CD. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=181 \pm 55$ kPa y $E=231 \pm 31$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 1mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Para el caso donde usamos 0.5mM M β CD tenemos una media de $E=191 \pm 35$ kPa y $E=177 \pm 38$ kPa para los no tratados, como observamos en la Figura 18.

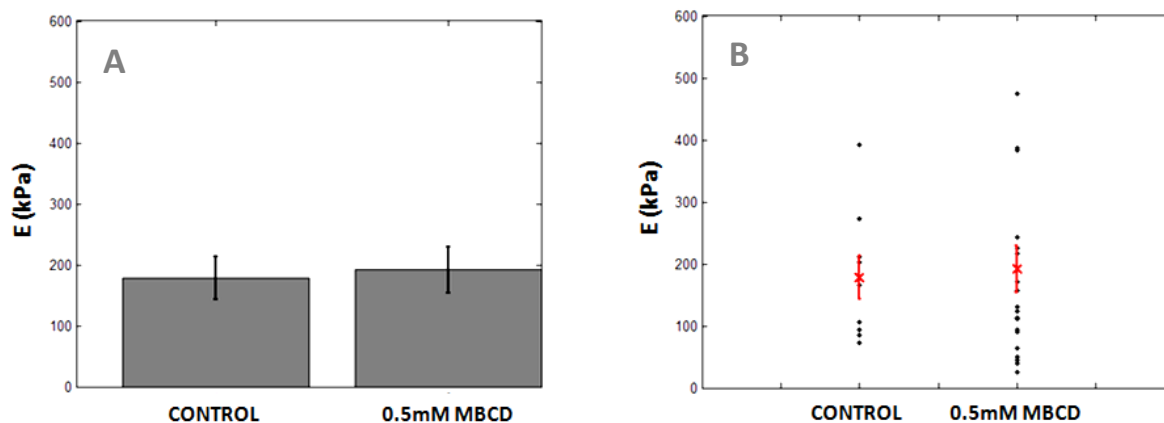


Figura 18. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 0.5mM de M β CD. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=191 \pm 35$ kPa y $E=177 \pm 38$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Comparando los resultados obtenidos usando las concentraciones de 0.1% y 0.05% de PLL con los de 0.01%, se puede ver que los módulos de elasticidad calculados se incrementaron, lo que nos permite pensar que al aumentar 5 ó 10 veces la concentración de PLL permitió una mejor adherencia de los espermatozoides al portaobjetos y por lo tanto el poder realizar mediciones confiables de la deformación de la células.

Es importante destacar que durante las mediciones, hubo un porcentaje de células que no se deformaron ante la aplicación del estímulo con el *jet* de liquido. Pudiendo así cuantificar el porcentaje de respuesta de la población. En la Figura 19 se resume el porcentaje de células que se deformaron a partir de la aplicación del *jet* de presión para las diferentes condiciones experimentales. De estos resultados podemos destacar que al menos en 3 de los grupos experimentales (Figura 19A, B y D) se observa que el porcentaje de espermatozoides que pueden ser deformados en nuestras condiciones experimentales es mayor cuando son tratados con M β CD comparados contra el control. Esto quiere decir que el tratamiento con M β CD favorece a obtener un mayor número de células que es posible deformar (poblacionalmente).

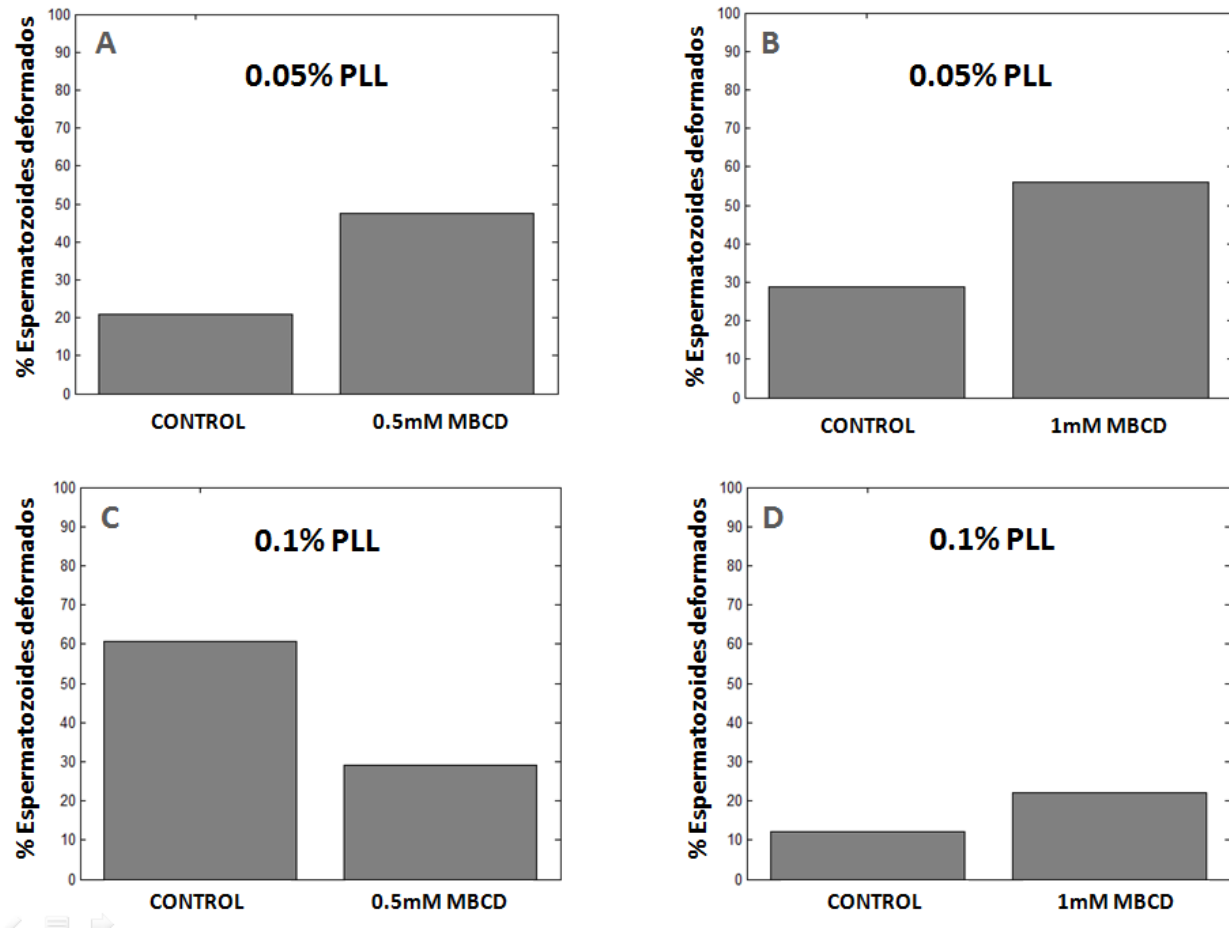


Figura 19. Porcentaje de células deformadas. (A) Usando PLL a una concentración del 0.05% como sustrato para la adhesión de los espermatozoides se obtuvo un porcentaje del 20.93% para el grupo control y 47.61% para las células tratadas con 0.5mM de MβCD. (B) Usando PLL a una concentración del 0.05% se obtuvo un porcentaje del 28.93% para el grupo control y 56.09% para las células tratadas con 1mM de MβCD. (C) Usando PLL a una concentración del 0.1% se obtuvo un porcentaje del 60.06% para el grupo control y 29.03% para las células tratadas con 0.5mM de MβCD. (D) Usando PLL a una concentración del 0.1% se obtuvo un porcentaje del 12.19% para el grupo control y 21.95% para las células tratadas con 1mM de MβCD.

En la Figura 20 se puede observar en forma de resumen general los resultados obtenidos para el cálculo de los módulos de elasticidad en las condiciones evaluadas anteriormente. Como primer observación tenemos que las células que fueron adheridas al vidrio usando una concentración del 0.05% de PLL, no presentaron diferencias significativas entre el grupo control, que presentó un módulo de elasticidad de $E=207 \pm 33$ kPa, y los dos grupos de células

tratadas con 0.5 mM y 1 mM M β CD para los que se obtuvo un módulo promedio de $E=191 \pm 38$ kPa y $E=181 \pm 31$ kPa, respectivamente.

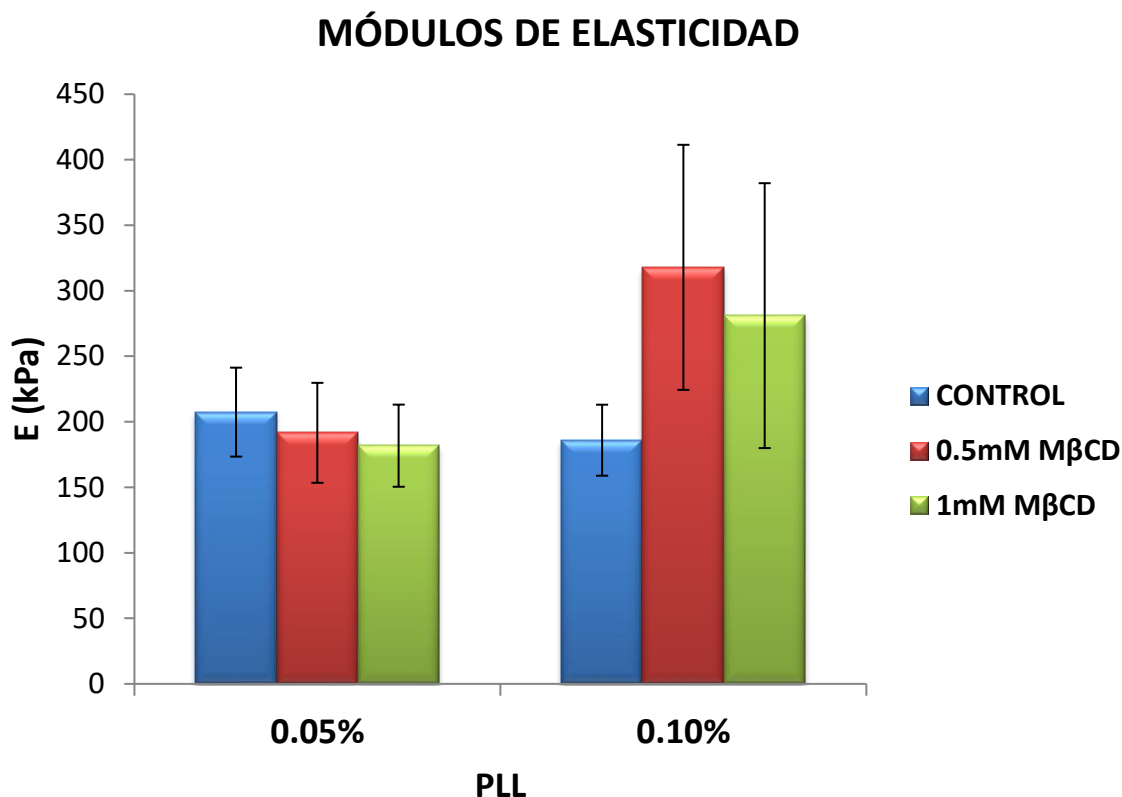


Figura 20. Módulos de elasticidad obtenidos con los distintos tratamientos de M β CD a dos concentraciones de PLL. En el caso donde se utilizó una concentración del 0.05% de PLL no existen diferencias significativas para el valor de E para ninguno de los dos tratamientos, 0.5mM y 1mM de M β CD, comparados contra el grupo control, el cual presentó un módulo de elasticidad $E \sim 200$ kPa. Al incrementar la concentración de PLL a 0.1% se observa un incremento en los módulos de elasticidad obtenidos para los espermatozoides tratados con 0.5mM y 1mM M β CD, sin embargo estos resultados no son estadísticamente significativos cuando se comparan con el grupo control. Para 0.05% de PLL se contó con una $n=20$ para el control, $n=20$ para 0.5mM M β CD y $n=23$ para 1mM. Para 0.1% de PLL se contó con una $n = 25$ para el control, $n=8$ para 0.5mM M β CD y $n=9$ para 1mM. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar.

Para el caso donde las células se adhirieron con 0.1% de PLL, tampoco se presentaron diferencias significativas entre el grupo control, donde se obtuvo un módulo de elasticidad de $E=185 \pm 27$ kPa, y los módulos registrados para las células con los tratamientos de 0.5 y 1mM de M β CD, donde, sin embargo se registraron valores del módulo de elasticidad promedio mayor en ambos casos, de $E=317 \pm 93$ kPa y $E=281 \pm 101$ kPa, respectivamente, indicándonos una posible

tendencia a la rigidización de la célula, aunque también podemos observar que la variabilidad observada en las mediciones es considerable, resultando en que aun con el incremento de los módulos de elasticidad obtenidos para las células tratadas no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos casos.

Adicionalmente, como parte del proceso experimental, se realizaron mediciones del grosor de la cabeza de los espermatozoides, para determinar un valor de referencia contra el cual se pudiera comparar la magnitud de las deformaciones debidas al estímulo del *jet* de presión que estuviéramos registrando, de tal forma que, cuando se observaran deformaciones mayores a las dimensiones del grosor de la célula, como en el caso mencionado anteriormente (Figura 14), pudiéramos discriminar la medición asumiendo que se trataba de un espermatozoide mal adherido al vidrio, por tanto, lo que estábamos registrando era producto de un desplazamiento completo de la célula flotando en el medio y no propiamente una deformación de la membrana plasmática. Obteniendo de forma inesperada, un promedio del grosor de $1.34 \pm 0.06 \mu\text{m}$ para los espermatozoides sin tratamiento y de $1.88 \pm 0.13 \mu\text{m}$ para los tratados con 1mM M β CD, en el caso donde se usó una concentración de PLL al 0.05% para adherir las células. Para el caso donde se usó PLL al 0.1% se obtuvo un grosor de $1.24 \pm 0.08 \mu\text{m}$ para los espermatozoides del grupo control y de $1.33 \pm 0.74 \mu\text{m}$ para los tratados con 1mM M β CD (Figura 21).

Como resultado de la prueba estadística se encontró que para el caso donde se utilizó una concentración de 0.05% de PLL existieron diferencias significativas entre el grosor de las células sin tratamiento contra las células tratadas con 1mM M β CD ($*P < 0.05$). Para el caso donde se utilizó 0.1% de PLL, las diferencias entre grupos no resultaron ser significativas.

De acuerdo con los resultados anteriores se optó por utilizar en los experimentos posteriores una concentración de 1mM de M β CD, que es la concentración máxima utilizada en nuestro estudio y por lo tanto, la concentración donde esperamos ver el mayor efecto en cuanto a remoción de colesterol de la membrana, a pesar de que no se hayan observado cambios significativos en las propiedades elásticas de los espermatozoides tratados, y de adherir las células usando portaobjetos tratados con 0.05% PLL, ya que es la concentración menor de las estudiadas, donde se observó que las células se adherían correctamente.

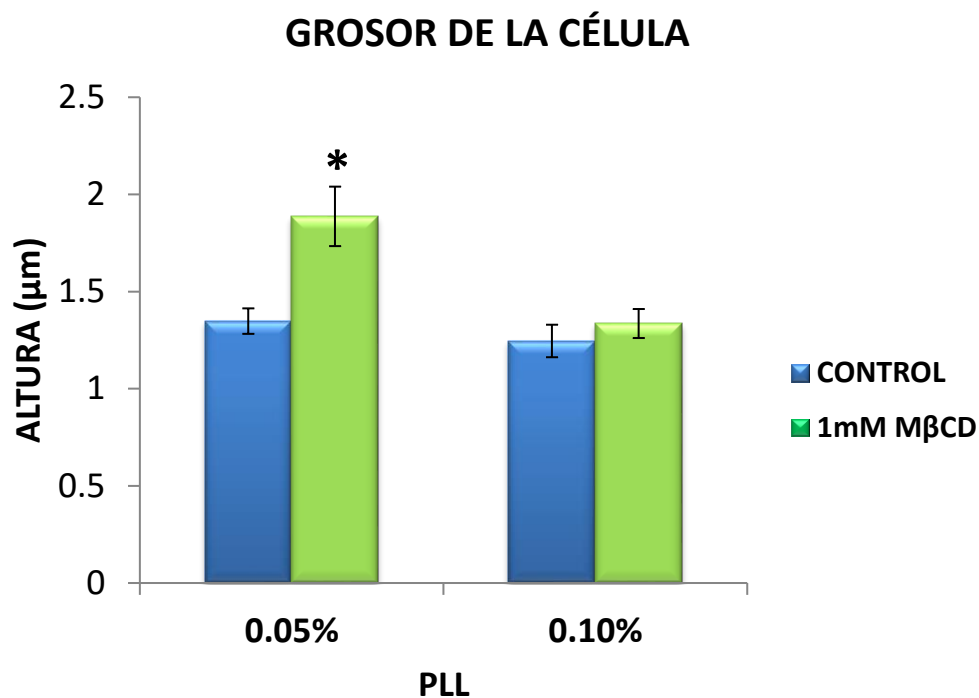


Figura 21. Comparación entre el grosor de la cabeza los espermatozoides. Se muestran los promedios en el grosor de los espermatozoides con y sin tratamiento de remoción de colesterol usando diferentes concentraciones de PLL como sustrato de adhesión. Para 0.05% de PLL se conto con una n=38 para el control y n=41 para 1mM. Para 0.1% de PLL se contó con una n=40 para el control y n=41 para 1mM. * $P < 0.05$. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar.

Análisis del efecto de MβCD y NaHCO₃ sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide

Debido a los espermatozoides incubados sólo con MβCD no se observó ningún cambio significativo en las propiedades elásticas del espermatozoide, se decidió investigar si es necesaria la presencia de NaHCO₃, que como se mencionó anteriormente la capacitación depende también de la presencia de bicarbonato en el medio.

En la Figura 22 se puede observar los módulos de elasticidad obtenidos cuando los espermatozoides son tratados con 1mM MβCD adicionado de 20mM de NaHCO₃.

En el caso del grupo sin tratamiento se obtuvo un módulo de elasticidad de $E=145 \pm 30$ kPa para las células sin tratamiento y $E=261 \pm 47$ kPa para las células tratadas con MβCD y NaHCO₃. A

pesar de que se observa un aumento en el valor de E en el grupo tratado, estos resultados no fueron estadísticamente diferentes.

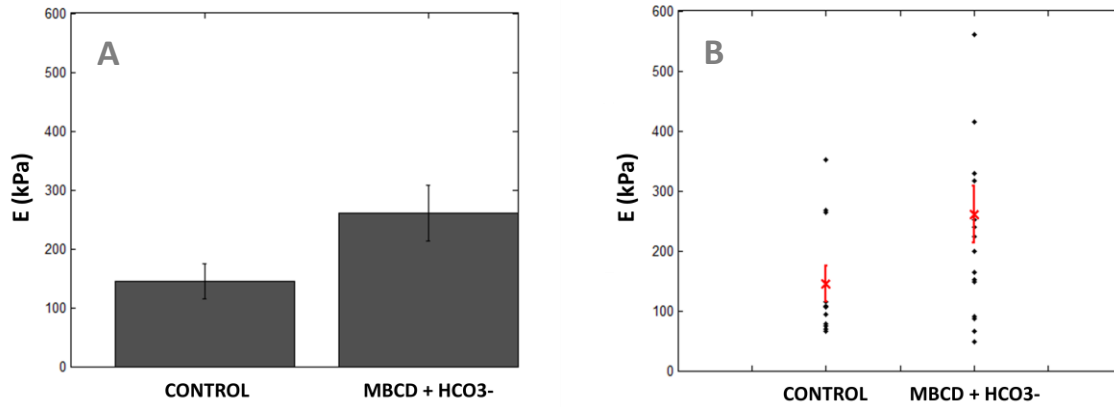


Figura 22. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con 1mM de M β CD adicionado con 20mM de NaHCO₃. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=145.17 \pm 30.06$ kPa y $E=261.13 \pm 47.41$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de M β CD. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

El porcentaje de células deformadas para estas condiciones (Figura 23) fue muy similar al observado en la Figura 19B, siendo consistente con lo mencionado anteriormente, que el tratamiento con M β CD incrementa la posibilidad de encontrar células deformables.

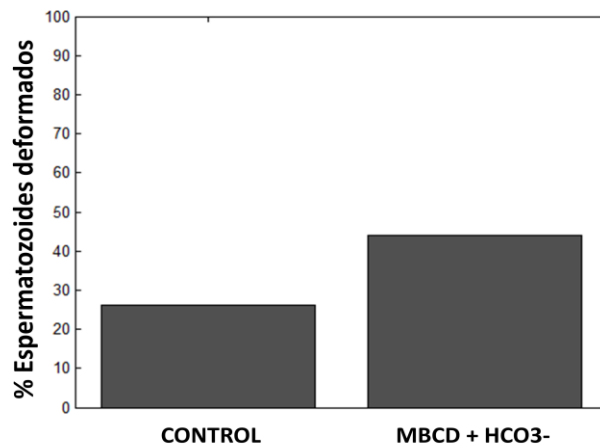


Figura 23. Porcentaje de células deformadas cuando son tratadas con 1mM de M β CD adicionado con 20mM de NaHCO₃. Se obtuvo un porcentaje del 26.19% para el grupo control y 43.90% para las células tratadas con 1mM de M β CD y adicionadas con 20mM de NaHCO₃.

Análisis del efecto de BSA y NaHCO₃ sobre las propiedades mecánicas del espermatozoide

La adición de BSA y NaHCO₃ al medio fisiológico de los espermatozoides es el protocolo más utilizado para realizar la capacitación *in vitro*. Es por eso que se tomaron registros de deformaciones para espermatozoides tratados bajo este protocolo, y arrojó como resultado un módulo de elasticidad de $E=227 \pm 23$ kPa y $E=225 \pm 33$ kPa para los espermatozoides control y los espermatozoides tratados con BSA y NaHCO₃, respectivamente (Figura 24).

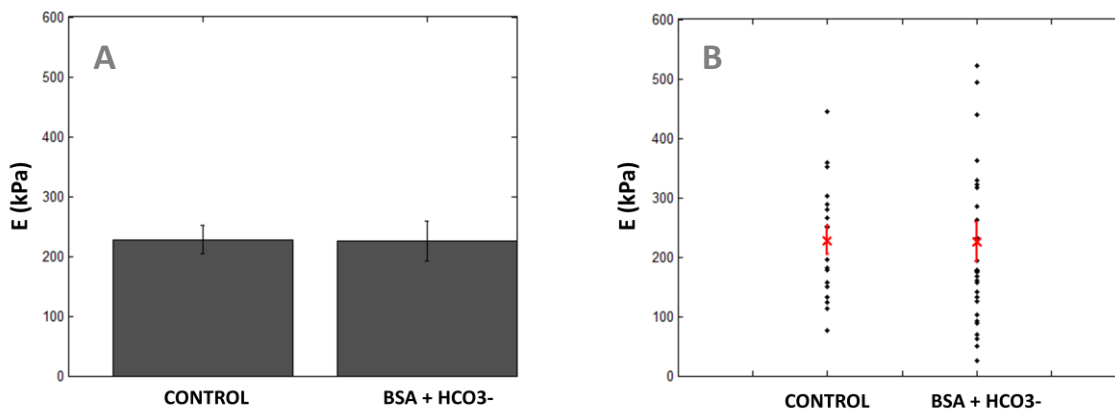


Figura 24. Módulos de elasticidad para espermatozoides adheridos al vidrio con 0.05% PLL y tratados con BSA al 0.5% adicionado con 20mM de NaHCO₃. En (A) observamos el módulo de elasticidad promedio para los espermatozoides sin remoción de colesterol $E=227 \pm 23$ kPa y $E=225 \pm 33$ kPa para los espermatozoides tratados con una concentración de 0.5mM de BSA adicionadas con 20mM de NaHCO₃. En (B) presentamos la dispersión de los datos obtenidos en cada grupo donde los puntos negros corresponden a los valores de E de cada célula y el promedio se indica en rojo.

Igual que en los casos anteriores se observa un mayor porcentaje de células que se logran registrar deformaciones en los espermatozoides tratados con BSA y NaHCO₃ comparado con los espermatozoides control (Figura 25).

La figura 26 muestra en forma comparativa los resultados obtenidos de los diferentes grupos experimentales. En ella podemos observar los módulos de elasticidad promedio para cada uno de nuestros grupos, obteniendo para nuestro grupo control (células sin tratamiento) un módulo de elasticidad promedio de $E= 200 \pm 17$ kPa, que comparado con los grupos tratados con M β CD $E= 181 \pm 31$ kPa, M β CD+NaHCO₃ $E=261 \pm 47$ kPa y BSA+NaHCO₃ $E=225 \pm 33$ kPa, donde las diferencias no fueron significativas.

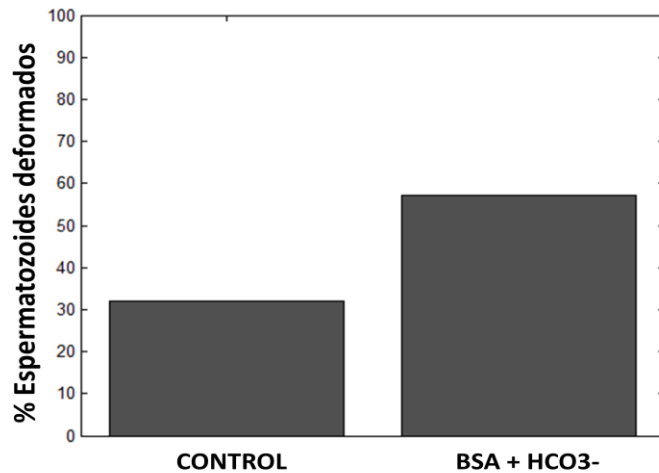


Figura 25. Porcentaje de células deformadas cuando son tratados con BSA al 0.5% y adicionado con 20mM de NaHCO₃. Se obtuvo un porcentaje del 32.14% para el grupo control y 57.14% para las células tratadas con BSA al 0.5% y adicionadas con 20mM de NaHCO₃.

Se anexaron las mediciones hechas en células espermatogénicas, como un control adicional, con el propósito de tener una comparativa contra otro tipo celular. Se eligieron espermatoцитos primarios del estadio de paquiteno, ya que presentan un mayor tamaño y forma globular (~16 μm de diámetro), por lo que se esperaba que presentaran propiedades mecánicas diferentes al espermatozoide. Es de importancia mencionar que estas células no se sometieron a ningún tratamiento para remover colesterol debido a que únicamente se deseaba obtener un módulo de elasticidad promedio de este tipo de células, y no es el propósito de este trabajo alterarlas de ninguna manera. En la Figura 26 se puede observar el módulo obtenido de $E = 22 \pm 3$ kPa, valor que se encuentra muy por debajo de los obtenidos para los espermatozoides con o sin tratamiento. Lo que de primera mano nos dice es que son células más flexibles, al ser más grandes, redondas y con un volumen mayor de citoplasma.

MÓDULOS DE ELASTICIDAD

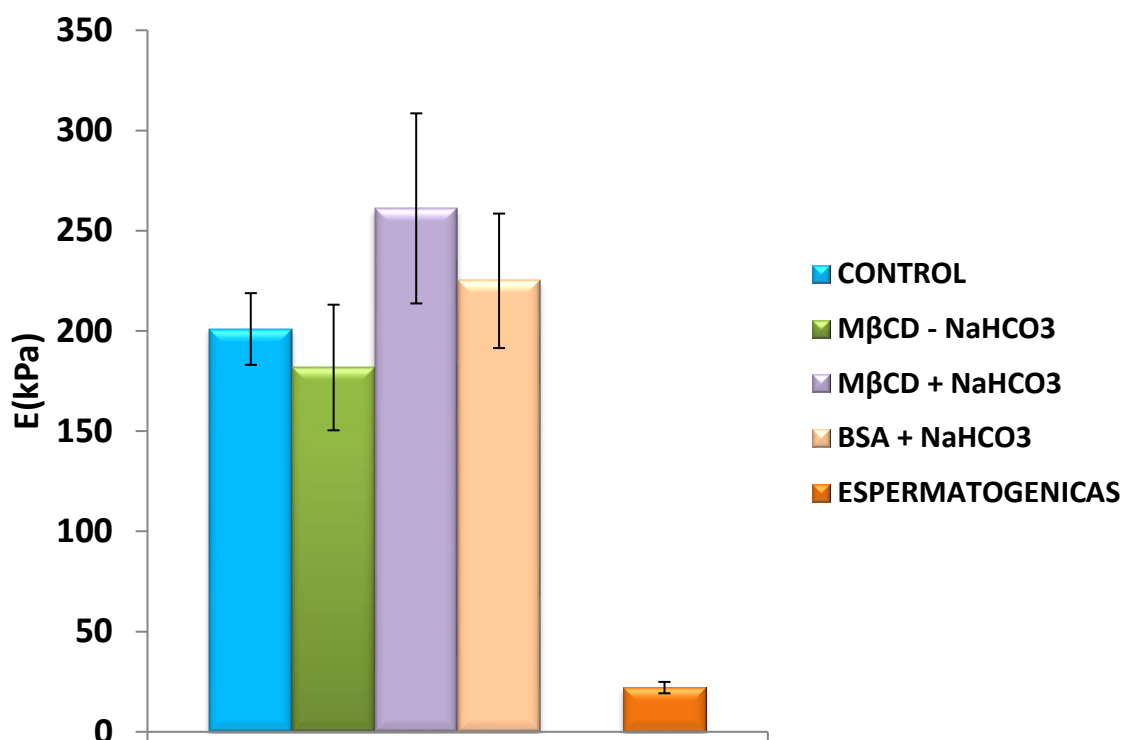


Figura 26. Comparación de módulos de elasticidad de nuestros grupos experimentales. Se muestran los promedios de cada uno de los grupos experimentales teniendo para el control $E=200 \pm 17$ kPa ($n=49$), M β CD $E=181 \pm 31$ kPa ($n=23$), M β CD+NaHCO₃ $E=261 \pm 47$ kPa ($n=18$) y BSA+NaHCO₃ $E=225 \pm 33$ kPa ($n=32$), obteniendo como resultado de la prueba estadística que no existen diferencias significativas en ninguno de ellos en comparación contra el grupo control. Se adicionó un grupo de células espermatogénicas para tener una comparativa con otro tipo celular con propiedades elásticas diferentes. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar.

Finalmente, como parte adicional del trabajo se encontró que el grosor de las células podría estar cambiando en las células sometidas a la remoción de colesterol, por lo tanto, se continuó registrando las mediciones del grosor de las células que fueron tratadas con M β CD+NaHCO₃ y BSA+NaHCO₃, obteniéndose para el primer caso un espesor promedio de $A=1.32 \pm 0.08$ μ m y de $A=1.51 \pm 0.05$ μ m para el segundo caso.

En un análisis comparativo, en la Figura 27 mostramos los diferentes grupos experimentales, y como lo mencionamos en la primera parte de este trabajo se encontró que las células tratadas únicamente con M β CD mostraban una diferencia significativa contra las células sin tratamiento. Caso contrario a lo que se obtuvo con las células tratadas con M β CD y NaHCO₃, grupo que no

tuvo diferencias significativas contra el control, sin embargo, al comparar el grupo tratado con BSA y NaHCO_3 se observó que sí aumentaba de manera significativa el espesor de las células comparada contra el control. En específico, estos resultados nos lleva a plantearnos nuevas preguntas, ¿Cuál es el mecanismo que está actuando para que se lleve a cabo este engrosamiento de la células? ¿De qué forma está actuando el NaHCO_3 con la M β CD para que se pierda este efecto? ¿Por qué cuando son tratadas con NaHCO_3 y BSA no se pierde este efecto? Preguntas que serán retomadas más adelante en la sección de discusión.

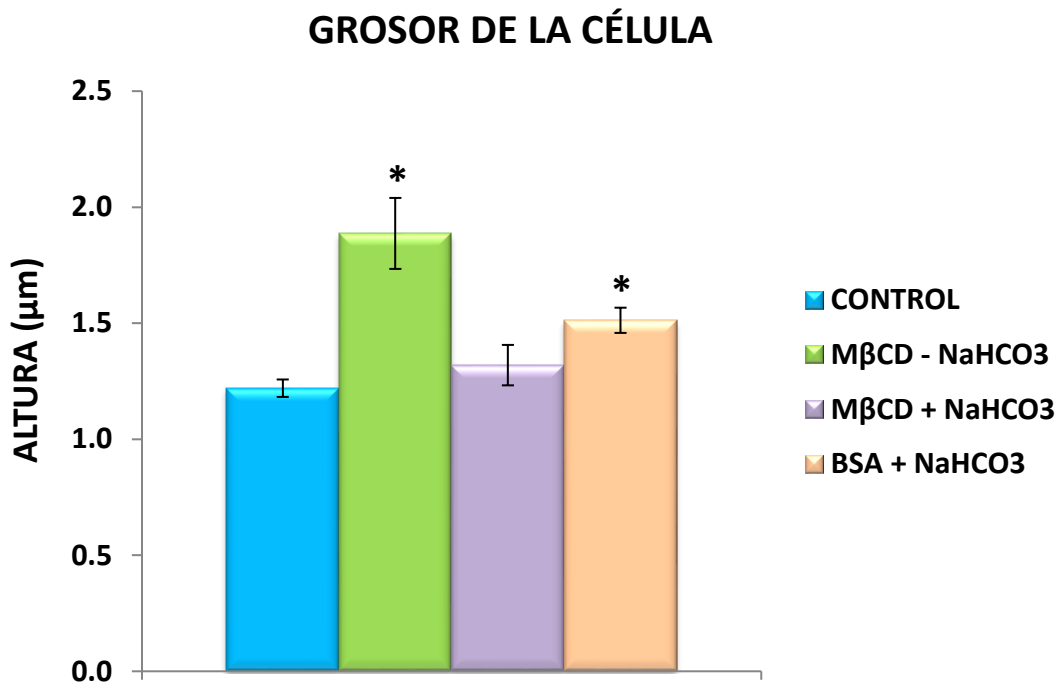


Figura 27. Comparación del grosor de los espermatozoides de nuestros grupos experimentales. Se muestran los promedios de cada uno de los grupos, para el grupo control $A=1.22 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ($n=136$), M β CD - NaHCO_3 $A=1.88 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ($n=41$), M β CD + NaHCO_3 $A=1.32 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($n=41$), BSA + NaHCO_3 $A=1.51 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ($n=56$). Como resultado de la prueba estadística se obtuvieron diferencias significativas en las células tratadas únicamente con M β CD y las que fueron tratadas con BSA y NaHCO_3 en comparación con el grupo control. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. El * denota $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

Se ha sugerido que la remoción de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides de mamífero es el disparador del proceso de capacitación que conlleva toda una serie de cambios fisiológicos, que van desde el reordenamiento lipídico y proteico dentro de la membrana plasmática hasta la activación de vías de señalización que incluyen fosforilación de proteínas e incremento en las permeabilidades iónicas de la membrana plasmática, donde estos diversos eventos pueden estar siendo favorecidos en mayor o menor proporción por los cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática. Existen evidencias donde se observa una migración de seminolípidos, los cuales se encuentran altamente concentrados en la parte apical de la cabeza del espermatozoide en células control, mientras que en espermatozoides capacitados estos seminolípidos migran hacia la parte ecuatorial de la célula, lo que sugieren que el proceso de capacitación pudiera estar favoreciendo la fluidez de la membrana (Flesch and Gadella 2000). Sin embargo, en nuestro estudio abordamos la caracterización de la rigidez de la membrana, teniendo en cuenta que estas dos características, fluidez y rigidez, pudieran tener una relación directa, de tal forma que en una membrana con módulos de elasticidad bajos, o sea una membrana menos rígida, estaría presentando característica de una mayor fluidez, no obstante, no existe evidencia que nos permita correlacionar estas características de forma directa para poder aseverar esto, pero podemos sugerir que lo están.

Al inicio de la experimentación para caracterizar el módulo de elasticidad de la membrana de espermatozoide, observamos que el polímero (PLL) que usamos como sustrato para que los espermatozoides se adhirieran no funcionaba adecuadamente a bajas concentraciones, por lo que se tuvo que incrementar la concentración, lográndose una mejor adherencia de las células, sin embargo al incrementar la concentración de PLL a 0.1% se observó que se producía un efecto de rigidización de las células ($E \sim 300 \text{kPa}$), esto podía deberse a la carga positiva del polímero, que a concentraciones altas esté tensionando a las células de modo que, al intentar deformarlas en nuestro ensayo, éstas ya estuvieran previamente tensionadas por la adherencia

al polímero, lo cual se traduce en módulos de elasticidad elevados como los observados en nuestras mediciones, y en comparación con los obtenidos para la condición donde se usó una menor concentración de PLL (Figura 20). La PLL se utiliza comúnmente como sustrato para cultivo celular, ya que los procesos de migración y división celular o proliferación requieren de sitios de anclaje (Raghavan et al. 2013), y se sabe que concentraciones elevadas de PLL tienen un efecto negativo sobre la viabilidad celular (Lu et al. 2009). Por otro lado, se sugiere que cuando se tratan los portaobjetos con el polímero PLL, éste no se distribuye uniformemente sobre el vidrio, causando que los espermatozoides no estén sujetos de una manera homogénea, por lo tanto esto puede estar influyendo negativamente en la variabilidad de nuestras muestras.

El módulo de elasticidad calculado a partir de nuestros experimentos para la membrana del espermatozoide de ratón presentó un valor elevado ($E \sim 200 \text{kPa}$) en comparación con los registrados para otros tipos celulares (Sánchez et al. 2008, Byfield et al. 2004), indicando que este tipo de células presentan una estructura muy rígida, lo que puede estar relacionada con las características particulares del espermatozoide, como el hecho de que es una célula muy pequeña, completamente diferenciada y prácticamente sin citoplasma, permitiéndonos pensar que la membrana plasmática esta interaccionando directamente con el citoesqueleto, reflejándose esta interacción en valores elevados del módulo de elasticidad. Existen evidencias que nos hablan de la rigidez de los espermatozoides de ratón, por ejemplo es prácticamente imposible romper la membrana para realizar parches de célula completa utilizando la técnica convencional de registros electrofisiológicos *patch-clamp*, debido a que la membrana del espermatozoide de ratón es poco elástica y presenta una morfología aplanada (Espinosa 1999), lo que se hace más evidente al tratar de hinchar el espermatozoide utilizando soluciones hipotónicas, en donde solo se logra un hinchado mínimo de la parte dorsal de la cabeza del espermatozoide, sin que se pierda su morfología característica, caso contrario a los espermatozoides de erizo de mar los cuales pierden completamente su morfología hinchándose al ser sometidos a estrés osmótico (Espinosa 1999). Se piensa que esta rigidez extrema del espermatozoide es conferida por las proteínas del citoesqueleto y por la presencia del núcleo que contiene el material genético supercondensado (Ochs et al. 1986, Longo et al. 1987).

Por otro lado, ninguno de los tratamientos experimentales indujo cambios significativos entre los módulos de elasticidad calculados, sin embargo, la razón de no encontrar diferencias entre nuestros grupos de estudio puede atribuirse principalmente a dos causas: la primera, a que las mediciones se realizaron en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, en donde la membrana plasmática no está tan enriquecida de colesterol. De acuerdo con reportes (Visconti et al. 1999), la membrana se encuentra enriquecida de colesterol principalmente en la parte apical de la cabeza del espermatozoide (Figura 28) y debido a que nuestras mediciones fueron realizadas en la parte ecuatorial de la cabeza, la cual presenta regiones enriquecidas de colesterol y regiones que no, es probable que esto sea una de las posibles fuentes de dispersión en nuestras mediciones y que al hacer un promedio, resulte en módulos semejantes entre las células control y las tratadas.

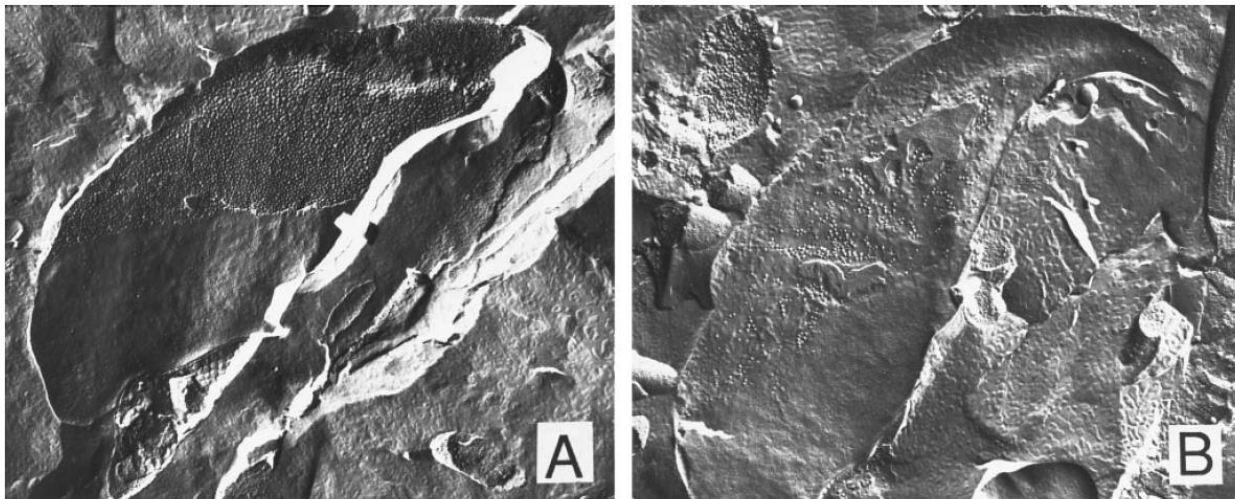


Figura 28. Identificación de complejos filipina-colesterol en espermatozoides de ratón. Microfotografías de transmisión electrónica en muestras de crio-fractura de (A) espermatozoides incubados en medio fisiológico sin BSA o (B) medio fisiológico adicionado con BSA. Los complejos formados entre colesterol y filipina toman estructuras esféricas, observando en (A) una mayor cantidad de estos complejos, localizada principalmente en la región apical de la cabeza, mientras que en (B) se observa una disminución en la cantidad y redistribución de los complejos formados como consecuencia de la remoción de colesterol por BSA. (Figura tomada de Visconti et al. 1999b).

La segunda causa que puede estar afectando nuestros resultados es la existencia de una reestructuración del citoesqueleto de la célula (Figura 29), se ha reportado que existe un incremento en la polimerización de actina durante el proceso de capacitación (Brener et al.

2003), evento que pudiera estar influenciando los valores de rigidez obtenidos, ya que una de las funciones principales del citoesqueleto es proveer el andamiaje interno de la célula y por lo tanto, cualquier alteración que se pudiera estar haciendo sobre la estructura lipídica de la membrana que la haga menos rígida al remover el colesterol, podría estar siendo enmascarada o neutralizada por la polimerización de nuevas fibras, lo que sería lo mismo decir que tenemos más puntos de sujeción y por eso mismo no logramos observar cambios en la rigidez de la membrana plasmática del espermatozoide.

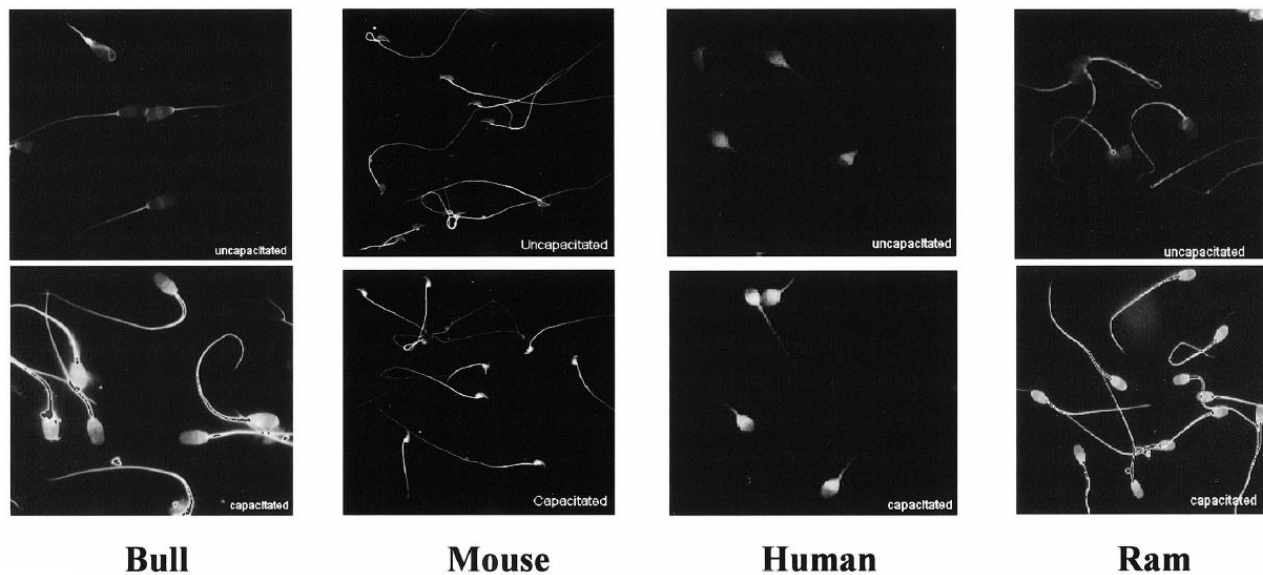


Figura 29. Polimerización de actina durante el proceso de capacitación en toro, ratón, humano y carnero. Imágenes de fluorescencia con tinción específica para actina. Las figuras en la parte superior corresponden a espermatozoides no capacitados de diferentes especies de mamíferos, mostrando una menor intensidad de fluorescencia, mientras que las imágenes de la parte inferior muestran una mayor intensidad de fluorescencia cuando los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes. Denotando que al capacitarse los espermatozoides incrementa la polimerización de actina (Figura tomada de Brener *et al.* 2002.)

Otro punto importante que se observa en nuestros resultados es el incremento en el grosor de la célula, fenómeno que se presenta en dos de los grupos experimentales estudiados, a pesar de que en todos ellos se tiene en común la remoción de colesterol de la membrana, esta puede darse en diferentes “grados”, dependiendo de la potencia del acarreador de colesterol usado. El primer caso donde ocurre el engrosamiento de la célula es donde únicamente se utilizó M β CD como tratamiento para remover colesterol, este aumento en el grosor de la célula puede

deberse a la reestructuración del citoesqueleto que ocurre durante el proceso de capacitación, como se mencionó anteriormente, sin embargo no se ha reportado que esta condición capacite a los espermatozoides. Caso contrario, donde tenemos la presencia de BSA y NaHCO_3 en el medio de incubación, la cual es la condición *in vitro* más utilizada para capacitar los espermatozoides y en donde nosotros observamos que se presenta el fenómeno de engrosamiento de la célula. Si efectivamente la polimerización de las fibras de actina del citoesqueleto es la razón para que ocurra este aumento en el grosor de la célula, entonces estaríamos hablando de que la simple remoción de colesterol de la membrana estaría disparando los mecanismos para que se lleve a cabo la polimerización de actina. Por otro lado, se sabe que la polimerización de fibras de actina es dependiente de Ca^{2+} (Gremm and Wegner 2000), siendo ésta regulada por proteínas de unión a actina, las cuales se conoce que se encuentran presentes en los espermatozoides de mamífero (Finkelstein et al. 2010), en específico se tienen reportes que durante el proceso de capacitación, la gelsolina, una proteína encargada de regular el ensamblaje o desensamblaje de las fibras de actina, se encuentra fosforilada y unida al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), lo que la mantiene en un estado inhibido y sólo se activa justo antes de la reacción acrosomal (Ickowicz et al. 2012). La activación de la fosfolipasa C (PLC) ocurre al incrementarse la concentración de Ca^{2+} intracelular, dando lugar a la hidrólisis del PIP_2 , permitiendo la liberación y activación de la gelsolina, la cual comienza a disociar las fibras de actina induciendo la reacción acrosomal (Ickowicz et al. 2012). Bajo este esquema, observamos que la regulación de la polimerización de las fibras de actina podría converger con las vías de fosforilación del proceso de capacitación, debido a que la PKA mantiene en un estado fosforilado a gelsolina, lo que es indispensable para mantenerla inactiva (Finkelstein et al. 2010).

Entonces, retomando nuestros resultados, podríamos decir que el engrosamiento de los espermatozoides tratados con BSA y NaHCO_3 (condición capacitante) corresponde con este fenómeno y estas condiciones llevan eventualmente a la activación de la PKA para la fosforilación de proteínas en tirosina (Visconti et al. 1999a).

Para el caso donde tratamos los espermatozoides con $\text{M}\beta\text{CD}$ y NaHCO_3 observamos que no había cambios en el grosor de las células aun siendo esta una condición reportada como

capacitante. Esto puede deberse a la alta eficiencia de la M β CD para remover colesterol de la membrana, y que este tratamiento sea más efectivo y no sólo lleve a los espermatozoides a un estado de capacitación, sino que los lleve a un estado post-capacitación donde ya se hubiese llevado a cabo la reacción acrosomal, recordando entonces que previo a la reacción acrosomal ocurre una rápida depolimerización de las fibras de actina, con lo que no se vería reflejado el engrosamiento en nuestros resultados.

Finalmente, en el caso donde se incubaron los espermatozoides en presencia de M β CD pero sin NaHCO₃, podría estar ocurriendo que la capacidad de la M β CD para remover el colesterol esté activando alguna vía de influjo de Ca²⁺, aumentando su concentración intracelular, lo cual activaría la adenilil ciclasa con una subsecuente activación de la PKA y de esta forma se podría fosforilar gelsolina inhibiéndola y permitiendo que la polimerización de actina se lleve a cabo y se vea reflejado en el aumento de grosor de la célula.

CONCLUSIONES

- El espermatozoide es una célula muy rígida y compacta, ya que presenta un módulo de elasticidad de $E \sim 200$ kPa, el cual no parece verse alterado por la remoción de colesterol de la membrana plasmática.
- Tanto la capacitación de los espermatozoides como el tratamiento con M β CD producen un engrosamiento de la cabeza de los espermatozoides.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar el uso de fármacos que rompan las fibras de actina del citoesqueleto de la célula con la finalidad de eliminar la posible contribución sobre la rigidez observada en los espermatozoides.
2. Calcular los coeficientes de difusión de los lípidos dentro de la membrana utilizando técnicas como el *Photobleaching* para relacionarlos con posibles cambios en la fluidez de la membrana.
3. Determinar si el efecto de engrosamiento de las células es debido al incremento en la polimerización de actina reportada durante la capacitación haciendo uso de activadores de reacción acrosomal.
4. Relacionar un estudio temporal de las permeabilidades iónicas del HCO_3^- y Ca^{2+} tras la adición de acarreadores de colesterol para profundizar en los mecanismos de acción de estos compuestos durante la capacitación.
5. Realizar ensayos para cuantificar reacción acrosomal en las condiciones antes estudiadas para poder correlacionar este estado de la célula con las propiedades observadas.
6. Validar con otras técnicas alternativas, como la microscopia de fuerza atómica (AFM), las propiedades mecánicas del espermatozoide de ratón y los parámetros caracterizados en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, Gadella BM "Capacitation-Dependent Reorganization Of Microdomains In The Apical Sperm Head Plasma Membrane: Functional Relationship With Zona Binding And The Zona-Induced Acrosome Reaction" *Theriogenology* 70, 1188–1196 (2008)

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J and Breitbart H "Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction" *Biology of Reproduction* 68, 837–845 (2003)

Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH, and Levitan I "Cholesterol Depletion Increases Membrane Stiffness of Aortic Endothelial Cells" *Biophysical Journal* 87, 3336–3343 (2004)

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R "Viability, Susceptibility To Peroxidation And Fatty Acid Composition Of Boar Semen During Liquid Storage" *Animal Reproduction Science* 58, 99–111 (2000)

Cisneros A, Sánchez D "cGMP And Cyclic Nucleotide-Gated Channels Participate In Mouse Sperm Capacitation" *FEBS Letters* 586, 149-153 (2012)

Darszon A, Guerrero A, Galindo BE, Nishigaki T And Wood CD "Sperm-Activating Peptides In The Regulation Of Ion Fluxes, Signal Transduction And Motility" *International Journal of Developmental Biology* 52, 595-606 (2008)

Das S, Saha S, Majumder GC, Dungdung SR "Purification and Characterization of a Sperm Motility Inhibiting Factor from Caprine Epididymal Plasma" *PLoS ONE* 5(8) e12039 (2010)

Espinosa F "Caracterización de canales iónicos y su participación en la fisiología del espermatozoide de ratón" Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica UNAM (1999)

Finkelstein M, Etkovitz N, and Breitbart H "Role and Regulation of Sperm Gelsolin Prior to Fertilization" *The Journal of Biological Chemistry* 285(51), 39702–39709 (2010)

Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B and Gadella BM "Bicarbonate Stimulated Phospholipid Scrambling Induces Cholesterol Redistribution And Enables Cholesterol Depletion In The Sperm Plasma Membrane" *Journal of Cell Science* 114, 3543-3555 (2001)

Flesch FM, Gadella BM "Dynamics Of The Mammalian Sperm Plasma Membrane In The Process Of Fertilization" *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 197-235 (2000)

García BM, Fernández LG , Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez AM, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D and Peña FJ "Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation" *Reproduction in Domestic Animals* 46, 141–148 (2011)

Gremm D and Wegner A "Gelsolin As A Calcium-Regulated Actin Filament-Capping Protein" *European Journal of Biochemistry* 267, 4339-4345 (2000)

Guyton AC and Hall JE "Tratado de fisiología médica" 11a Edición, Ed. Elsevier Saunders., Capítulos 80-82 pag 996-1041 (2009)

Hanukoglu I "Steroidogenic Enzymes: Structure, Function, And Role In Regulation Of Steroid Hormone Biosynthesis" *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43(8), 779-804 (1992)

Harrison RAP, Gadella BM "Bicarbonate-Induced Membrane Processing In Sperm Capacitation" *Theriogenology* 63, 342–351 (2005)

Huang WM, Gibson SJ, Facer P, Gu J, and Polak JM "Improved Section Adhesion for Immunocytochemistry Using High Molecular Weight Polymers of L-Lysine as a Slide Coating" *Histochemistry* 77, 275-279 (1983)

Iborra A, Companyó M, Martínez P and Morros A "Cholesterol Efflux Promotes Acrosome Reaction in Goat Spermatozoa" *Biology of Reproduction* 62, 378–383 (2000)

Ickowicz D, Finkelstein M and Breitbart H "Mechanism Of Sperm Capacitation And The Acrosome Reaction: Role Of Protein Kinases" *Asian Journal of Andrology* 14, 816–821 (2012)

Khosrowbeygi A, Zarghami N "Fatty Acid Composition Of Human Spermatozoa And Seminal Plasma Levels Of Oxidative Stress Biomarkers In Subfertile Males" *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77, 117–121 (2007)

Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG "Lipid Changes In The Aged Brain: Effect On Synaptic Function And Neuronal Survival" *Progress in Lipid Research* 51, 23–35 (2012)

Lenzi A, Picardo M, Gandini L and Dondero F "Lipids Of The Sperm Plasma Membrane: From Polyunsaturated Fatty Acids Considered As Markers Of Sperm Function To Possible Scavenger Therapy" *Human Reproduction Update* 2(3), 246–256 (1996)

Long JA, Bongalhardo DC, Pelaez J, Saxena S, Settar P, O'Sullivan NP and Fulton JE "Rooster Semen Cryopreservation: Effect Of Pedigree Line And Male Age On Postthaw Sperm Function" *Poultry Science* 89, 966–973 (2010)

Longo FJ, Krolme G and Franke WW "Basic Proteins of the Perinuclear Theca of Mammalian Spermatozoa and Spermatids: A Novel Class of Cytoskeletal Elements" *The Journal of Cell Biology* 105, 1105-1120 (1987)

Lu H, Guo L, Kawazoe N, Tateishi T and Chen G "Effects of Poly- L-lysine, Poly-acrylic acid and Poly-ethylene glycol on the Adhesion, Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells" *Journal of Biomaterials Science* 20 577–589 (2009)

Miranda PV, Allaire A, Sosnik J and Visconti PE "Localization of Low-Density Detergent-Resistant Membrane Proteins in Intact and Acrosome-Reacted Mouse Sperm" *Biology of Reproduction* 80, 897–904 (2009)

Nelson DL, Cox MM "Lehninger Principles of Biochemistry" 5a Edición, Ed. W. H. Freeman, Capítulo 11 pag 371-418 (2008)

Nixon B, Mitchell LA, Anderson AL, McLaughlin EA, O'Bryan MK and AITKEN RJ "Proteomic and Functional Analysis of Human Sperm Detergent Resistant Membranes" *Journal of Cell Physiology* 226, 2651–2665 (2011)

Ochs D, Wolf DP and Ochs RL "Intermediate Filament Proteins in Human Sperm Heads" *Experimental Cell Research* 167, 495-504 (1986)

Orädd G, Lindblom G, Westerman PW "Lateral diffusion of cholesterol and dimyristoylphosphatidylcholine in a lipid bilayer measured by pulsed field gradient NMR spectroscopy" *Biophysical Journal* 83(5), 2702–2704 (2002)

Payne AH, Hales DB "Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway From Cholesterol to Active Steroid Hormones" *Endocrine Reviews* 25(6), 947–970 (2004)

Peter M, Dubuis JM "Transcription Factors As Regulators Of Steroidogenic P-450 Enzymes" *European Journal of Clinical Investigation* 30(Suppl. 3), 14–20 (2000)

Primakoff P and Myles DG "Penetration, Adhesion and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction" *Science* 296(21), 2183-2185 (2002)

Raghavan S, Gilmont RR, Bitar KN "Neuroglial Differentiation Of Adult Enteric Neuronal Progenitor Cells As A Function Of Extracellular Matrix Composition" *Biomaterials* 34, 6649-6658 (2013)

Sanchez D, Johnson N, Li C, Novak P, Rheinlaender J, Zhang Y, Anand U, Anand P, Gorelik J, Frolenkov GI, Benham C, Lab M, Ostanin VP, Schaffer TE, Klenerman D and Korchev YE "Noncontact Measurement of The Local Mechanical Properties of Living Cells Using Pressure Applied Via a Pipette" *Biophysical Journal* 95, 3017–3027 (2008)

Serway RA and Beichner RJ "Física Para Ciencias e Ingeniería - Tomo I" 5a Edición, Ed. CENGAGE Learning, Capitulo 12 pag 361-388 (2002)

Simons K & Ikonen E "Functional Rafts In Cell Membranes" *Nature* 387, 569-572 (1997)

Tapia JA, Macias-Garcia B, Miro-Moran A, Ortega-Ferrusola C, Salido GM, Peña FJ and Aparicio IM "The Membrane Of The Mammalian Spermatozoa: Much More Than An Inert Envelope" *Reproduction on Domestic Animals* 47(Suppl. 3), 65–75 (2012)

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P and Kopf GS "Capacitation of Mouse Spermatozoa I. Correlation Between The Capacitation State And Protein Tyrosine Phosphorylation" *Development* 121, 1129-1137 (1995)

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG and Kopf GS "Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction In Mammalian Sperm: B-Cyclodextrins

Initiate Transmembrane Signaling Leading To An Increase In Protein Tyrosine Phosphorylation and Capacitation" 274(5), 3235–3242, (1999a)

Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA and Kopf GS "Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation" *Developmental Biology* 214, 429–443 (1999b)

Yanagimachi R, Cherr G, Matsubara T, Andoh T, Harumi T, Vines C, Pillai M, Griffin G, Matsubara M, Weatherby T and Kaneshiro K "Sperm Attractant in the Micropyle Region of Fish and Insect Eggs" *Biology of Reproduction* 88(2):47, 1–11 (2013)

Yeagle PL "Modulation of Membrane Function by Cholesterol" *Biochemistry* 73, 1303-1310 (1991)