

Enrique Castellón - Andreína Cesari - Miguel Fornés

# Biología de la gameta masculina

Desde lo básico a nuevos enfoques  
para preguntas conocidas

Universidad Nacional  
de Mar del Plata



# Biología de la Gameta Masculina

*Desde lo básico a nuevos enfoques  
para preguntas conocidas*

**Enrique Castellón  
Andreina Cesari  
Miguel Walter Fornés**



Castellón, Enrique

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

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-4440-22-8

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

Título

CDD 571.845

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

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

ISBN: 978-987-4440-22-8

Este libro fue evaluado por el Dr. Mariano Buffone

Fecha de edición: mayo 2018

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

© 2018, EUDEM

Editorial de la Universidad Nacional de Mar del Plata

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

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



Libro  
Universitario  
Argentino

**Nota introductoria:**

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



## INDICE

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

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

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

***Lucia Zalazar***

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

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

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

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

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

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

ocurren en el espermatozoide como la capacitación, hiperactivación del flagelo y la reacción acrosomal, procesos como ya se ha mencionado, desencadenados principalmente por la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$  dentro de la gameta.

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

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

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

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

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

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

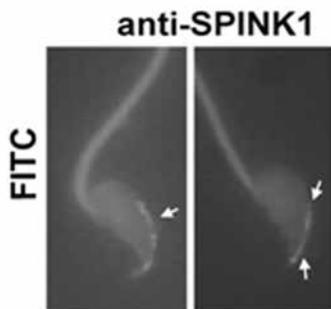
La familia Kunitz también está representada en el tracto reproductor masculino. En testículo (humano, ratón y rata), se ha encontrado al inhibidor de serina proteasas de tipo Kunitz (familia I2) SPINT2 (Odet y col. 2006).

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

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

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

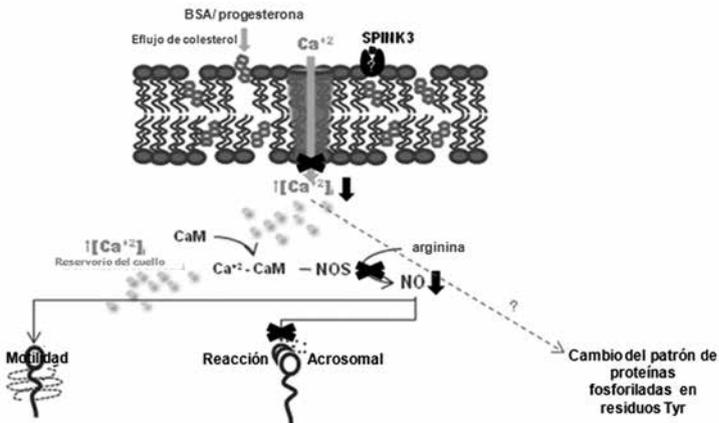
Mediante dos aproximaciones experimentales --electroforesis bidimensional y cromatografía de afinidad tripsina-agarosa- nuestro grupo reportó la presencia de SPINK3 en vesícula seminal de ratón. Se trata de un inhibidor que se expresa en vesícula seminal bajo regulación androgénica pero es constitutivo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



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

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

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



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

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

## Referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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