

# Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides humanos capacitados

Mitochondrial membrane potential evaluation in capacitated human sperm

Luisa F. Ospina-Medina MSc<sup>1</sup>, Walter D. Cardona-Maya PhD<sup>2</sup>

**Introducción:** los espermatozoides humanos durante su viaje por el tracto reproductivo sufren el proceso de capacitación espermática, evento indispensable para la fecundación y que se ha relacionado con cambios en el potencial de membrana mitocondrial. **Objetivos:** evaluar el efecto de la capacitación espermática sobre el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides humanos. **Materiales y métodos:** se realizó un estudio *in vitro* en el cual se seleccionaron los espermatozoides puros de nueve voluntarios, los cuales se sometieron a condiciones capacitantes durante seis horas. Posteriormente, se evaluó el efecto de la capacitación sobre el estado del potencial de membrana mitocondrial usando el colorante DiOC<sub>6</sub>(3) por citometría de flujo. **Resultados:** de las nueve muestras seminales evaluadas cinco presentaron mayor intensidad media de fluorescencia en el potencial de membrana mitocondrial poscapitación. Todas las muestras seminales mostraron parámetros normales y no presentaron cambios en la movilidad y la viabilidad espermática durante la selección y la capacitación espermática *in vitro*. **Conclusiones:** las modificaciones en el potencial de membrana mitocondrial en respuesta al proceso de capacitación demuestra que existen diferentes poblaciones espermáticas en el eyaculado humano; entender cuál está relacionada con el proceso reproductivo exitoso permitirá aumentar la probabilidad de embarazos.

**Palabras clave:** espermatozoides, fertilidad, capacitación espermática, mitocondrias, movilidad espermática.

**Introduction:** Human spermatozoa during their journey through the reproductive tract undergo the capacitation process, an essential event for the fertilization and which has been related with changes in membrane mitochondrial potential. **Objective:** To evaluate the effect of capacitation process on mitochondrial membrane potential in human sperm. **Materials and methods:** An *in vitro* study in which pure sperm from nine semen samples were incubated in capacitated conditions for six hours. Subsequently, the capacitation effect on the state of mitochondrial membrane potential using

<sup>1</sup>Microbióloga y Bioanalista. Candidata a MSc en Biología, Universidad de Antioquia. Investigadora asociada Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, PhD en Biología. Docente Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co/wdcmaya@gmail.com

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses  
Medicina & Laboratorio 2015; 21: 375-382

Módulo 19 (Investigación), número 36. Editora Médica Colombiana S.A. 2015®  
Recibido el 15 de julio de 2015; aceptado el 25 de agosto de 2015

DiOC<sub>6</sub>(3) dye through flow cytometry were evaluated. **Results:** Nine semen samples were evaluated; five had higher mean fluorescence intensity in the mitochondrial membrane potential post capacitation. All semen samples had normal seminal parameters and none of them showed changes in motility and sperm viability during recovery and in vitro capacitation. **Conclusions:** Changes in the mitochondrial membrane potential in response to the capacitation process shows that there are different sperm populations in the human ejaculated; understand which are related to the successful reproductive process will increase the likelihood of pregnancy.

**Keywords:** Spermatozoa, fertility, sperm capacitation, mitochondria, sperm motility.

**Ospina-Medina LF, Cardona-Maya WD.** Potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides humanos capacitados. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 375-382.

La reproducción humana involucra la interacción de un espermatozoide con un oocito; no obstante, generalmente los problemas reproductivos están asociados a las mujeres por su obvia relación con el embarazo, cuando el 50% de los problemas en las parejas en edad reproductiva son por causa masculina [1,2]. El espermograma es, hasta la fecha, la única y mejor herramienta para evaluar el potencial fértil del hombre [3,4], aunque en los últimos años se han postulado las pruebas funcionales como una herramienta importante en la valoración del factor masculino [5-9].

Durante su viaje por el tracto reproductivo femenino en busca del oocito, los espermatozoides sufren el proceso de capacitación espermática, un conjunto de modificaciones fisiológicas y bioquímicas que involucran la remoción de colesterol, la fosforilación de residuos de tirosina en distintas proteínas, el incremento del pH intracelular y del calcio citoplasmático, preparando la célula para la reacción acrosomal [10,11]. En algunas especies se ha logrado establecer que el proceso de capacitación está asociado con la hiperpolarización de la membrana plasmática, es decir, con el incremento de las cargas negativas al interior de la célula, al ser comparadas con el ambiente extracelular [12] y que en los espermatozoides capacitados el potencial de membrana plasmática se encuentra entre -38 y -55 milivoltios (mV) en muridos y entre -33 y -66 mV en bovinos (citado en [13]). Recientemente, López-González y colaboradores (2014) [14] demostraron un mayor número de espermatozoides capacitados con hiperpolarización de su membrana plasmática respecto a los no capacitados.

Además, la capacitación espermática está relacionada con cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), un flujo de protones desde la membrana interna de la mitocondria que es aprovechado por la enzima ATP sintasa para la generación de ATP a partir de la fosforilación del ADP [15]. En roedores, las mitocondrias espermáticas se polarizan luego de la maduración de las células en el epidídimo y, en humanos, el proceso de capacitación se ha asociado con un cambio notable en el volumen mitocondrial, lo que sugiere que la activación o hiperpolarización de las mitocondrias es crucial para el proceso de fecundación [15], además, se ha determinado que las subpoblaciones de espermatozoides que cuentan con un potencial de membrana mitocondrial alto tienen mayor potencial fecundante [16]. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la capacitación espermática en espermatozoides humanos sobre el potencial de membrana mitocondrial.

## Materiales y métodos

### Obtención de los espermatozoides móviles

Se obtuvieron espermatozoides móviles de nueve muestras de semen provenientes de voluntarios normozoospermicos aparentemente sanos, de la ciudad de Medellín, Colombia, después de una abstinencia sexual de tres a cinco días. Una vez las muestras de semen completaron el período de licuefacción (aproximadamente una hora poseyaculación) se realizó un gradiente de densidad empleando el estuche comercial PureSperm® (Nidacon International AB, Mölndal, Suecia) para obtener los espermatozoides puros y móviles. Brevemente, a un tubo cónico de 15 mL se adicionaron 300 µL de la fase más densa (PureSperm® 80), 300 µL de la fase menos densa (PureSperm® 40) y 500 µL a 800 µL de semen, y se centrifugó durante 20 minutos a 1.500 rpm. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y el botón de espermatozoides móviles fue resuspendido en 1 mL de medio HAM-F12 (GIBCO®, Grand Island, Nueva York, Estados Unidos) y se cuantificó la concentración espermática empleando la cámara de Makler [17].

### Incubación de los espermatozoides en condiciones de capacitación

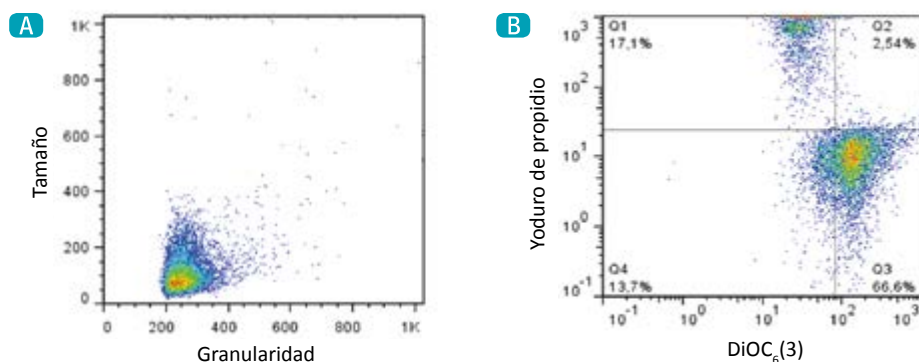
Diez millones de espermatozoides fueron incubados a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante seis horas en condiciones capacitantes (HAM-F12 suplementado con albúmina sérica bovina, 10 mg/mL) y no capacitantes (en ausencia de albúmina sérica bovina). La movilidad y la viabilidad espermática fueron evaluadas en las muestras de semen al inicio, al realizar la selección de los espermatozoides y después de la capacitación, siguiendo los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud [18-20].

### Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides se determinó en el citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter Inc., Brea, California, Estados Unidos). Para esto se incubaron, previamente,  $2 \times 10^6$  de espermatozoides con el colorante yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3), 10 nM; Molecular Probes Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), un colorante lipofílico permeable a la célula que se une a las mitocondrias de las células vivas, y el colorante vital yoduro de propidio (PI, 12 µM, Molecular Probes Inc.) en 300 µL de PBS (GIBCO®) durante 20 minutos [21].

### Análisis de las citometrías de flujo y análisis estadístico

Los análisis de las citometrías de flujo fueron realizados en el software FlowJo 7.6.2 (Tree Star Inc., Ashland, Oregón, Estados Unidos). Inicialmente, se realizó la exclusión de agregados mediante la selección de la población celular de interés después de realizar el contraste entre el tamaño y la granularidad. Posteriormente, en la población de interés seleccionada se contrarrestaron las células positivas para DiOC<sub>6</sub>(3) en relación con las negativas para el yoduro de propidio (véase figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo de la selección de la población de interés para el análisis del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides humanos. **A.** Selección de la población celular mediante contraste de tamaño y granularidad. **B.** Contraste entre las células positivas para yoduro de propidio (PI) y DiOC<sub>6</sub>(3). Q1= células muertas, positivas para PI y negativas para DiOC<sub>6</sub>(3); Q2= células muertas, positivas para PI y DiOC<sub>6</sub>(3); Q3=células vivas, negativas para PI y positivas para DiOC<sub>6</sub>(3); y, Q4=células vivas, negativas para PI y que no incorporaron DiOC<sub>6</sub>(3).

## Análisis estadístico

Los valores fueron contrastados mediante una prueba de t-student con el fin de establecer la diferencia entre las poblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados. Estas determinaciones se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, Estados Unidos).

## Resultados

### Información demográfica y características seminales de los donantes

Las muestras de semen fueron donadas por nueve voluntarios aparentemente sanos de la ciudad de Medellín, Colombia, entre los 18 y los 28 años de edad ( $24 \pm 2,6$  años), después de tres a cinco días de abstinencia sexual. Todas las muestras seminales fueron normozoospermicas de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud: volumen ( $4,6 \pm 2,8$  mL), movilidad ( $68 \pm 7\%$ ), viabilidad ( $77 \pm 6\%$ ) y concentración ( $76,5 \pm 35,8$  millones/mL).

### Movilidad y viabilidad antes, durante y después de la capacitación espermática

Como era de esperar, en todas las muestras seminales usadas, con los parámetros seminales normales (normozoospermicas), la movilidad y la viabilidad no se vieron afectadas por la recuperación o la capacitación espermática *in vitro* ( $p > 0,05$ ; véase figura 2).

### Potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides capacitados y no capacitados

Al comparar la intensidad media de fluorescencia para el DiOC<sub>6</sub>(3) de las poblaciones de espermatozoides capacitados y no capacitados se observó que en cinco de los nueve individuos los espermatozoides capacitados presentaron mayores niveles en su potencial de membrana mitocondrial, mientras

que en los cuatro restantes la capacitación indujo un menor potencial de membrana mitocondrial (véase figura 3 y tabla 1).

Como se observa en la tabla 1, el rango del porcentaje de células con alto potencial de membrana mitocondrial fue similar en el primer grupo de datos (5/9 muestras), encontrando en espermatozoides capacitados entre 66% y 85%, y en los no capacitados entre 50% y 86% ( $p > 0,05$ ); no obstante, se encontró diferencia ( $p < 0,05$ ) en los valores de intensidad media de fluorescencia entre las poblaciones de espermatozoides capacitados y los no capacitados, con rangos entre 167 a 470 y 125 a 370 unidades, respectivamente.

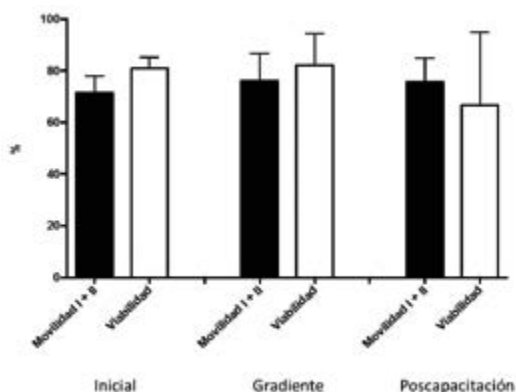


Figura 2. Media del porcentaje de viabilidad y movilidad espermática de las muestras seminales de los donantes en función del tiempo ( $n=9$ ).

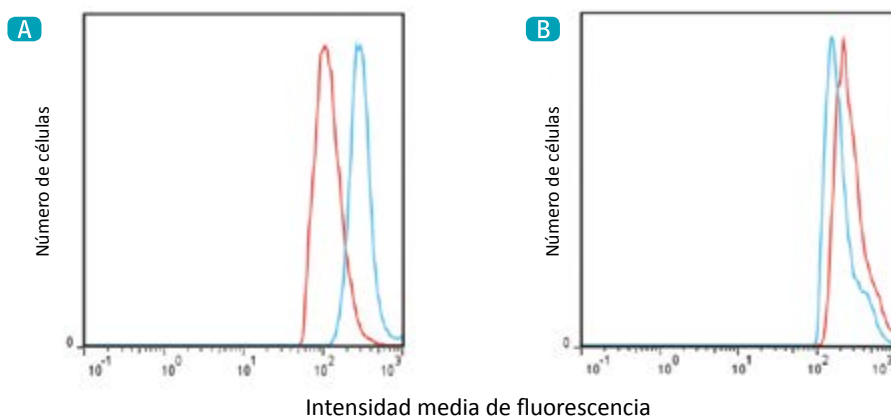


Figura 3. Esquemas representativos de la comparación del potencial de membrana mitocondrial entre las poblaciones de espermatozoides capacitados (azul) y no capacitados (rojos). En cinco de nueve análisis se observó que la capacitación está asociada con un mayor potencial de membrana mitocondrial (A) y en cuatro de nueve análisis con menor potencial de membrana mitocondrial (B).

De forma similar, en el segundo grupo de datos (4/9 muestras), el rango de porcentaje de células con alto potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides capacitados se encontró entre 47% y 85% y en los no capacitados entre 41% y 91% ( $p > 0,05$ ), con un rango de intensidades medias de fluorescencia entre 81 y 273 unidades para los primeros y entre 192 a 383 para los segundos ( $p > 0,05$ ).

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no existen diferencias en los porcentajes de espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto entre las células capacitadas y las no capacitadas; sin embargo, existe una diferencia significativa en las intensidades medias

**Tabla 1. Porcentaje e intensidad media de fluorescencia en las muestras de espermatozoides capacitados y no capacitados (n=9)**

Grupo 1: espermatozoides capacitados con mayor potencial de membrana mitocondrial (n=5)				Grupo 2: espermatozoides capacitados con menor potencial de membrana mitocondrial (n=4)			
Individuo	Condición	Células con alto potencial de membrana mitocondrial (%)	Intensidad media de fluorescencia DiOC <sub>6</sub> (3)	Individuo	Condición	Células con alto potencial de membrana mitocondrial (%)	Intensidad media de fluorescencia DiOC <sub>6</sub> (3)
1	Capacitados	66,6	167	1	Capacitados	53,1	81,3
	No capacitados	50,7	125		No capacitados	41,6	192
2	Capacitados	85,4	310	2	Capacitados	47,2	273
	No capacitados	76,9	126		No capacitados	50,4	383
3	Capacitados	74,8	429	3	Capacitados	79,7	247
	No capacitados	66,9	370		No capacitados	74,4	331
4	Capacitados	81,9	399	4	Capacitados	85,2	216
	No capacitados	86,3	250		No capacitados	91,2	293
5	Capacitados	79,5	470				
	No capacitados	76,1	321				

de fluorescencia del DiOC<sub>6</sub>(3) en los espermatozoides capacitados respecto a los no capacitados en las muestras de los donantes voluntarios estudiados. En el grupo 1 los espermatozoides capacitados incorporaron más colorante en sus mitocondrias y, por lo tanto, reflejaron un mayor potencial de membrana mitocondrial respecto a los espermatozoides no capacitados, lo que indica que en estos espermatozoides la capacitación tuvo una mayor actividad mitocondrial; contrario a lo encontrado en los espermatozoides del grupo 2.

De manera similar, en el estudio realizado por López-González y colaboradores (2014) [14] se presentaron diferencias en el rango de intensidad de fluorescencia del yoduro de 3,3'-dipropil-tiadicarbocianina (DiSC<sub>3</sub>(5)), un marcador del potencial de membrana plasmática, lo que sugiere una gran heterogeneidad entre el análisis de los espermatozoides de los diversos individuos. No obstante, se observó que en los espermatozoides capacitados el rango superior de los valores de intensidad de fluorescencia fue mayor que el mismo rango en los espermatozoides no capacitados, que sugiere la hiperpolarización del potencial de la membrana plasmática en los espermatozoides capacitados, tal como sucedió en el grupo 1 de este estudio con el potencial de membrana mitocondrial.

En el grupo 2 de espermatozoides se observó una mayor intensidad media de fluorescencia del DiOC<sub>6</sub>(3) en los espermatozoides no capacitados, lo que sugiere un mayor potencial de membrana mitocondrial en las células precapacitadas. Este hallazgo permitiría postular que el espermatozoide posiblemente necesita desencadenar otras vías celulares por definir para activarse en el tracto reproductivo femenino y encontrar el oocito para la fecundación.

## Conclusiones

El presente estudio permitió evidenciar que existen diferentes poblaciones espermáticas en el eyaculado que además varían entre los individuos con respuestas diferenciales al proceso de capacitación. Por tal razón, es necesario realizar más estudios que permitan entender el mecanismo fisiológico del proceso de capacitación y su relación con la actividad mitocondrial en los espermatozoides, y qué papel desempeñan las diversas poblaciones espermáticas con diferente potencial de membrana mitocondrial en la infertilidad de origen masculino, de manera que se pueda impactar sobre la probabilidad de embarazos.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Estrategia de Sostenibilidad Grupo Reproducción de la Universidad de Antioquia.

## Bibliografía

- Ospina Medina L, Lalinde Acevedo P, Álvarez A, Cañón D, Mayorga Torres B, Puerta Suarez J, et al. Infertilidad masculina y su relación con algunas condiciones médicas. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 57-71.
- Cruz DF, Lume C, Silva JV, Nunes A, Castro I, Silva R, et al. Oxidative stress markers: Can they be used to evaluate human sperm quality? *Turk J Urol* 2015; 41: 198-207.
- Toro Montoya AI. Espemograma. *Medicina & Laboratorio* 2009; 15: 145-169.
- Puerta-Suárez J, Giraldo M, Cadavid AP, Cardona-Maya W. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2014; 79: 209-217.
- Mayorga-Torres BJ, Camargo M, Agarwal A, du Plessis SS, Cadavid AP, Cardona Maya WD. Influence of ejaculation frequency on seminal parameters. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 47.
- Mayorga Torres JM, Peña B, Cadavid AP, Cardona Maya WD. La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2015; 80: 265-268.
- Cardona Maya WD, Berdugo Gutierrez JA, de los Rios J, Cadavid Jaramillo AP. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Arch Esp Urol* 2007; 60: 827-831.
- Cano-Cháves A, Galarzo-Pardo S, Puerta-Suárez J, Giraldo M, Cadavid A, Cardona-Maya WD. Efecto de las bacterias uropatógenas y de los factores solubles de su metabolismo sobre la calidad espermática: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. *Clin Invest Ginecol Obstet* 2015; Nov 13 [Epub ahead of print].
- Cadavid JA, Alvarez A, Markert UR, Cardona Maya W. Differential protein expression in seminal plasma from fertile and infertile males. *J Hum Reprod Sci* 2014; 7: 206-211.
- de Jonge CJ, Barratt CLR. *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Nueva York, Estados Unidos: Cambridge University Press; 2006.
- Fraser LR. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 9-19.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, et al. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2003; 278: 7001-7009.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 2006; 281: 5623-5633.
- López-Gonzalez I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi C, Darszon A, et al. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 619-629.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 2013; 146: R163-174.
- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, et al. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One* 2011; 6: e18112.
- Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la

- cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol Esp* 2008; 32: 443-445.
18. **Cardona Maya W.** Límite inferior de referencia-nuevos valores de referencia en el análisis seminal. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 93-94.
  19. **World Health Organization.** WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (ed 5ta). Ginebra, Suiza: WHO Press; 2010.
  20. **Cardona Maya W.** Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol Esp* 2010; 34: 577-578.
  21. **Mayorga-Torres BJ, Cardona-Maya W, Cadavid A, Camargo M.** Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol Esp* 2013; 37: 221-227.



Queenstown, New Zealand.

Carlos Alberto Lozano M. [carlos.lozano@iatm.com.co](mailto:carlos.lozano@iatm.com.co)