



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la Pentoxifilina sobre la movilidad de
espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo
de rata.

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciatura en Biología.

PRESENTA:

Juan Carlos Zúñiga Morales

ASESOR DE TESIS:

D. en C. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Noviembre 2015

Agradecimientos.

Agradezco a mi padre Jesús y mi madre Minerva por confiar en mí, por darme la confianza y el apoyo para trazarme esta meta en mi vida y más que nada por el apoyo para cumplirla, por siempre estar ahí cuando los necesité, y siempre ayudarme a salir adelante y superar mis errores.

A mi hermano Jesús por su ayuda, consejos y regaños en todos estos años.

A la Dra. Rosalina Reyes Luna por ser una excelente maestra y tutora, por permitirme trabajar en el laboratorio de biología de la reproducción y por todo lo que me enseñó dentro del aula, del laboratorio y fuera de ellos.

Al Profesor Ubaldo Quiroz López, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme aprender de él tanto en lo académico como en lo personal.

A cada uno de los profesores que conocí en la escuela, ya que aprendí mucho de cada uno de ellos, pero sobre todo a la Dra. Rosalina Reyes Luna, la Dra. Dolores López Morales, al Maestro Juan Carlos Flores Alonso y al Maestro Ubaldo Quiroz López, ya que su manera de transmitir el conocimiento que cada uno de ellos posee, fueron las bases para que cada día me interesara más por la biología y terminara apasionándome por esta área.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología de la Reproducción y del laboratorio de Histofisiología: Fernanda, Gaby, Germán, Mariana, Nancy, Pravda, Max, Fernando, Martín Macías, por permitirme pasar tiempo con ellos. También agradezco a los compañeros con los que pude compartir salón de clases incluso aquellos que eligieron buscar un camino fuera de la escuela.

A mis amigos Edgar de la Luz, Gustavo Hidalgo y Eduardo Corona por estos 13 años de amistad y siempre darme ánimos a su muy peculiar manera de hacerlo.

También quiero agradecer al Dr. Carlos Escamilla, al Dr. Francisco y todo el equipo del bioterio Claude Bernard por proporcionar y apoyar en el cuidado de los

animales utilizados en esta tesis y al Dr. Isaías Javier Rivera Castillo por proporcionar la Pentoxifilina utilizada durante este proyecto.

Dedicatoria.

Quiero dedicar este trabajo a aquellas personas que a lo largo de estos años me han apoyado de manera incondicional y siempre han estado ahí sin importar las circunstancias, mis padres Jesús y Minerva. Se los dedico con todo mi cariño y agradecimiento, por el trabajo y esfuerzo que día a día llevaron a cabo para que saliéramos adelante. Este logro en vida se los debo a ustedes, ya que gracias a su ayuda y motivación me permitieron salir adelante aun cuando cometí errores.

Índice.

Resumen.	6
Introducción.	7
Espermatogénesis.	7
Estructura del espermatozoide.	9
Epidídimo.	12
Transporte de espermatozoides.	14
Maduración de espermatozoides en el epidídimo.	15
Movilidad espermática.	16
Antecedentes.	19
Justificación.	24
Hipótesis.	25
Objetivo General:	25
Objetivos particulares:	25
Material y Métodos.	26
Concentración espermática.	27
Determinación velocidad curvilínea.	29
Determinación de motilidad espermática.	30
Análisis estadístico.	30
Velocidad Curvilínea.	31
Motilidad.	31
Resultados.	32
Velocidad Curvilínea.	32
Motilidad espermática.	35
Discusión.	38
Conclusiones.	41
Bibliografía.	42
Anexo A.	52
Fórmula de solución mR1ECM	52
Fórmula de solución de conteo de espermatozoides.	52

Resumen.

La pentoxifilina es un derivado de la metilxantina, la cual se considera un promotor de movimiento de los espermatozoides, actualmente su principal uso es para la activación de espermatozoides inmóviles provenientes de testículo, los cuales son utilizados en la técnica de reproducción asistida conocida como inyección intracitoplasmática (ICSI). El objetivo de este estudio fue evaluar si la pentoxifilina promueve la activación del movimiento de espermatozoides provenientes de las diferentes regiones del epidídimo (Cabeza, cuerpo y cola), además de evaluar si altera la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides; para esto se utilizaron concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0 y 5.0 mM, con periodos de incubación de 15 minutos, para el grupo control no se agregó pentoxifilina y fue reemplazada por solución fisiológica. Los resultados indican que la pentoxifilina a concentraciones de 5.0 mM aumentó el porcentaje de motilidad progresiva en los espermatozoides obtenidos de cabeza y cuerpo de epidídimo con una significancia de $P < 0.05$ y $P < 0.001$ respectivamente. La motilidad in situ y total también se vieron beneficiadas por la administración de la pentoxifilina en las diferentes concentraciones, aunque estadísticamente estos aumentos no fueron significativos; por su parte, espermatozoides de cola de epidídimo solamente se vieron ligeramente beneficiados bajo concentraciones de 5.0 mM, aunque tampoco se vio significancia estadística. La pentoxifilina no influyó en la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides de ninguna de las regiones del epidídimo, sin embargo, los espermatozoides de cabeza muestran una ligera tendencia de incremento de velocidad conforme la concentración del fármaco es mayor. Se concluye que la pentoxifilina favorece la activación de la motilidad progresiva de espermatozoides de cabeza y cuerpo de epidídimo, sin alterar la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides en ninguna de las regiones del epidídimo, además se concluye que los efectos de la pentoxifilina son visibles en las células menos maduras.

Introducción.

La infertilidad afecta aproximadamente al 15% de las parejas, el factor masculino está implicado en la mitad de los casos (Safarinejad et., 2011) y es considerada la motilidad espermática como uno de los parámetros más importantes que determina la capacidad fecundante de los espermatozoides (Kinutani, 1999; Calogero et al, 1998). Dichos problemas han disminuido gracias al desarrollo de las técnicas de reproducción asistida y al uso de fármacos que activan la motilidad espermática. La técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI) ha cobrado gran importancia ya que permite el uso de espermatozoides inmóviles los cuales son tratados con estos fármacos para activar su movilidad y de esta manera se puede escoger un espermatozoide metabólicamente activo que se puede usar en este procedimiento (Tasdemir, Tasdemir, Tavukcuoglu, 1998). También, la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) ha mostrado avances gracias al uso de estos fármacos, ya que existe una estrecha relación entre la calidad del movimiento espermático y el éxito de la FIV (Kinutani, 1999).

Espermatogénesis.

El espermatozoide es el resultado final de la espermatogénesis, proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos. Inicia en la adolescencia y se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos en el humano. Por lo general este proceso está dividido en tres fases: en la primera fase, conocida como fase proliferativa o mitótica, las células germinales inmaduras conocidas como espermatogonias entran en una serie de divisiones mitóticas, produciendo dos tipos de espermatogonias, unas continúan con el linaje de éstas como células germinales y otras continúan con su maduración y entrarán a meiosis. En la segunda fase conocida como fase meiótica, las células entran en meiosis, en este momento se les denomina espermatocitos primarios, los cuales dan lugar a los espermatocitos secundarios al terminar la meiosis I y estas células se diferencian

en espermátides al término de la meiosis II. En la tercera fase, las espermátides entran en un proceso de diferenciación y maduración conocido como espermiogénesis (Fig. 1), donde éstas células llevan a cabo los siguientes procesos: reducen el tamaño nuclear, condensan el material genético por la sustitución de histonas por protaminas, forman la vesícula acrosómica a partir del aparato de Golgi, crece un flagelo a partir de la región centriolar, las mitocondrias se acomodan en la parte proximal del flagelo y el citoplasma se reduce y se separa formando el cuerpo residual o gota citoplasmática (Alberts et al., 2008; Chocu et al., 2012).

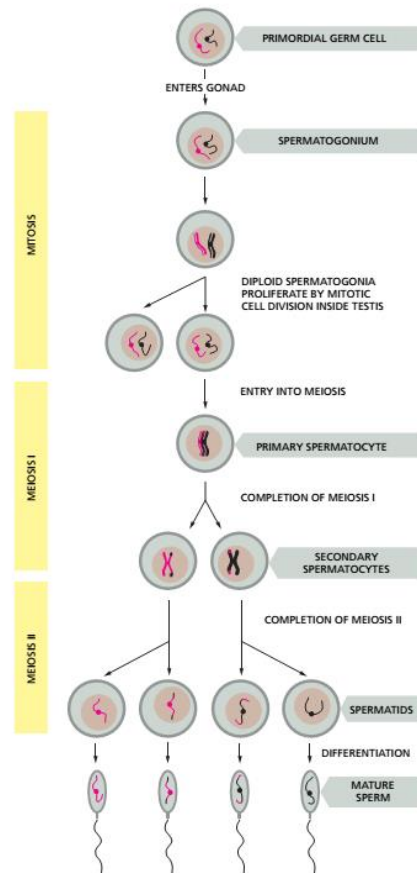


Fig. 1. Esquematación del proceso de espermatogénesis. Obtenido de Alberts *et al.* 2008.

Estructura del espermatozoide.

El espermatozoide está formado por una cabeza y un flagelo, los cuales se encuentran unidos por una pieza conectora o cuello (Fig. 2). La cabeza de los espermatozoides de mamíferos contiene el núcleo y el acrosoma, los cuales se encuentran rodeados por pequeñas porciones del citoesqueleto y el citoplasma (Eddy, 2006). La mayoría de los espermatozoides de mamíferos tienen una cabeza de forma espatulada, con el núcleo y el acrosoma aplanado del eje anterior-posterior del esperma, además, estas dos estructuras son simétricas. Por otra parte, los espermatozoides de algunos roedores tienen una cabeza con forma falciforme, en la cual el acrosoma recubre el borde convexo del núcleo (Fig. 3) (Fawcett, 1975).

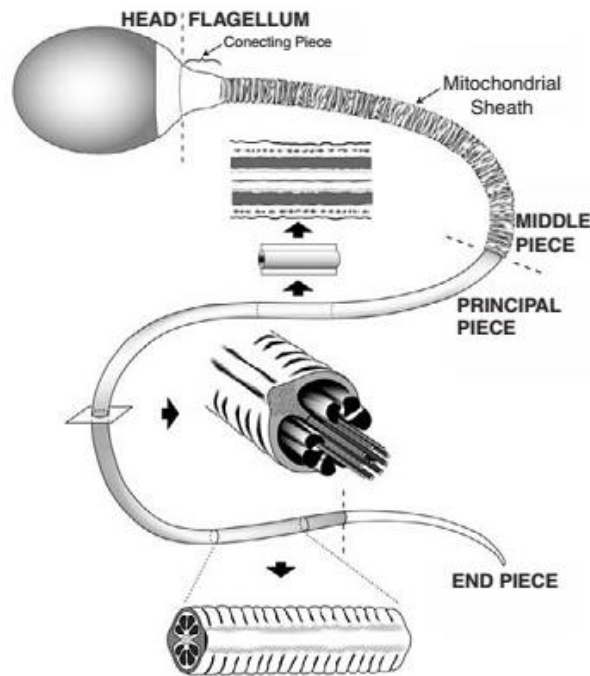


Fig. 2. Estructura básica de un espermatozoide de mamífero. Obtenido de Eddy. 2006.

El acrosoma es un organelo único en el espermatozoide el cual se origina a partir del complejo de Golgi y contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide logre penetrar al ovocito y lograr la fertilización. El acrosoma consiste en dos segmentos, la tapa acrosomal (acrosoma anterior) y el segmento ecuatorial (acrosoma posterior) que corresponden a la distribución de los dominios de la membrana plasmática con los mismos nombres. En espermatozoides con cabeza espatulada el segmento ecuatorial forma una banda que cubre aproximadamente el ecuador de la cabeza de los espermatozoides, mientras que en espermatozoides con cabeza falciforme el segmento ecuatorial puede cubrir gran parte de las superficies laterales de la cabeza (Eddy, 2006., Fawcett, 1970).

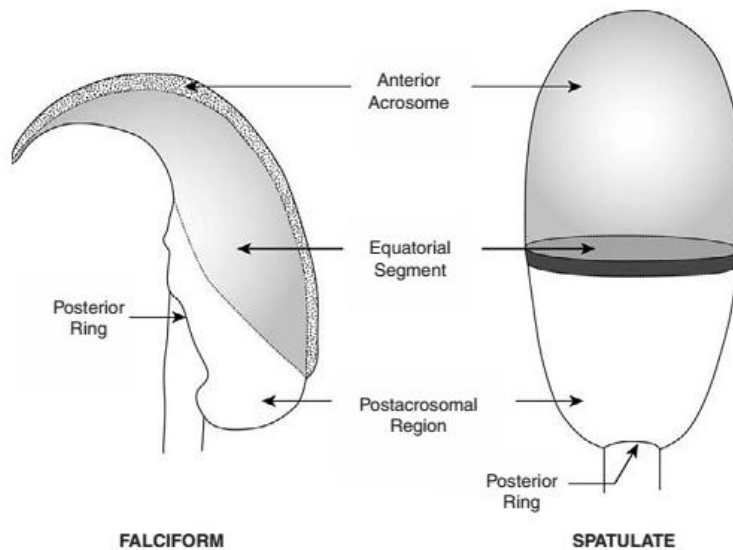


Fig. 3. Representación del acrosoma en una cabeza de espermatozoide falciforme y una cabeza espatulada. Extraído de Eddy. 2006.

El flagelo de los espermatozoides de mamíferos consiste en 4 diferentes segmentos: la pieza conectora (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza final (Fig. 2). Los principales componentes estructurales del flagelo son: el axonema, la vaina de mitocondrias, las fibras densas externas, y la vaina fibrosa

(Fig. 4). El axonema está compuesto por un complejo de microtúbulos "9 + 2" (9 pares de microtúbulos periféricos y 1 central) el cual se extiende a lo largo de todo el flagelo, los pares de microtúbulos externos constan de microtúbulos A y B: Del microtúbulo A surgen prolongaciones de dineína (brazos de dineína) los cuales son fundamentales para movimiento del flagelo del espermatozoide, estos brazos de dineína van en dirección al microtúbulo B del par contiguo del que surgen. Las fibras densas externas se encuentran contiguas al axonema y se extienden desde el cuello a la porción posterior de la pieza principal. La vaina de mitocondrias rodea a las fibras densas exteriores en la parte de la pieza media, mientras que la vaina fibrosa rodea las fibras densas exteriores en la pieza principal. La base del flagelo colinda con el núcleo en la unión entre la cabeza y el cuello (Eddy., 2006., Zamboni, Stefanini., 1971).

El flagelo proporciona la fuerza necesaria para que el espermatozoide se desplace para poder llegar a la superficie del ovocito y de esta manera conseguir la fecundación. Los diferentes elementos del flagelo generan y dan forma a las ondas de flexión que producen esta fuerza, las cuales se propagan desde la base hasta la punta (Eddy, 2006). El tamaño de los espermatozoides difiere entre especies, los espermatozoides de conejo tienen una longitud aproximada de 46 μm , los de ratón miden 120 μm de largo, por su parte en ratas la longitud media de los espermatozoides es de 190 μm (Phillips, 1972).

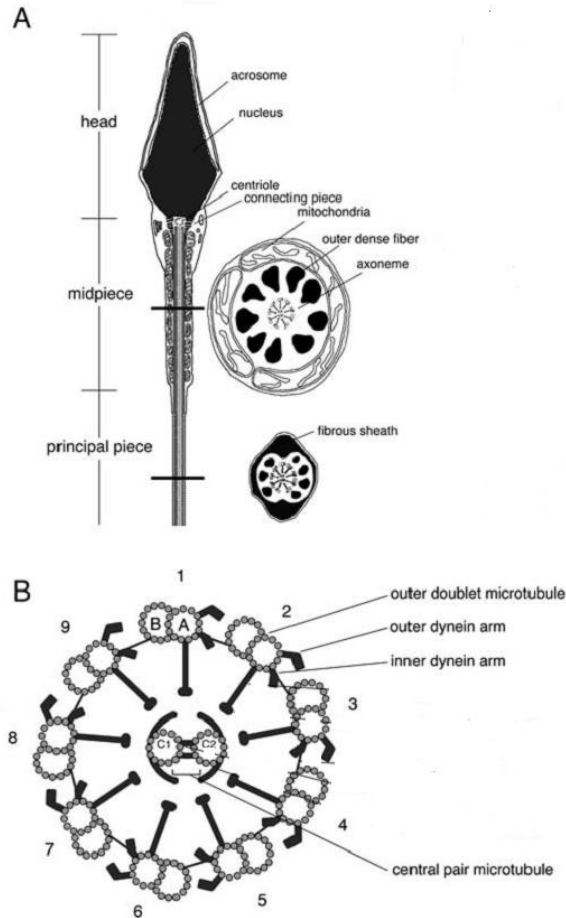


Fig. 4. A) Estructura de la cabeza y flagelo del espermatozoide. B) Estructura del axonema de flagelo de espermatozoide. Modificado de Inaba. 2011.

Epidídimo.

Después de salir de los testículos, los espermatozoides de los mamíferos son inmóviles y no son capaces de fertilizar, requieren que se sometan a dos procesos pos-testiculares conocidos como la maduración del espermatozoide y la capacitación, a fin de obtener su habilidad fertilizante. La maduración del espermatozoide se produce durante su tránsito por epidídimo. El epidídimo es un epitelio pseudoestratificado que puede ser anatómicamente diferenciado en cuatro regiones principales: un segmento inicial proximal (IS) que es la región más cercana a los conductos

eferentes que conectan los testículos al epidídimo y posteriormente los segmentos cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda) (Joseph, Shur, Hess., 2011; Krapf et al., 2012; Zhou et al., 2004) (Fig. 5).

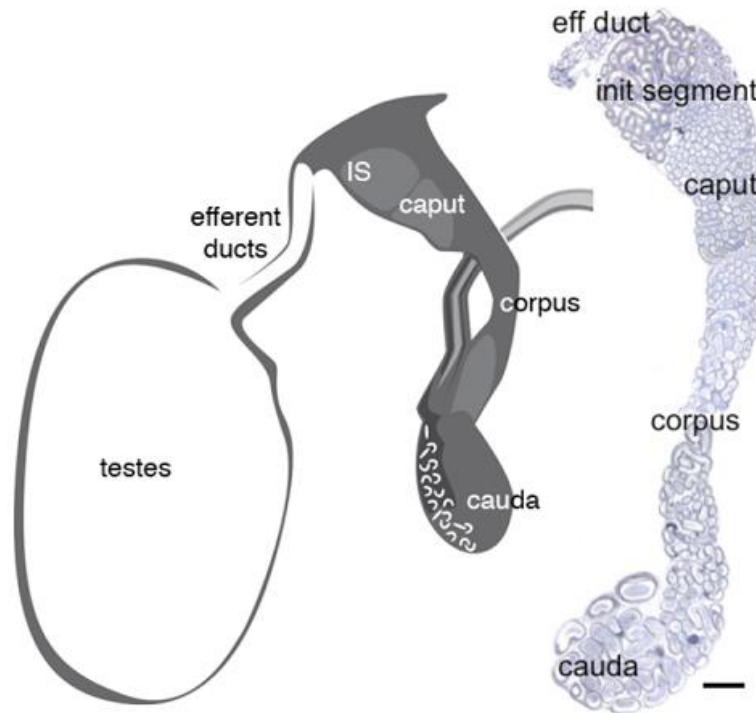


Fig. 5. Esquematación y representación histológica del epidídimo. Obtenido de Joseph, Shur, Hess., 2011.

La principal función del epidídimo es proporcionar un entorno luminal que transforma espermatozoides inmaduros en células completamente maduras. Además del papel de maduración de espermatozoides el epidídimo también juega un papel importante en las funciones de transporte, protección y almacenaje (Joseph, Shur, Hess., 2011).

El tejido del epidídimo está compuesto por varios tipos de células como lo son: Células principales, basales, claras, estrechas, apicales y Células de Halo. La célula que compone en su mayoría al epidídimo son las células principales, las cuales constituyen aproximadamente el 80% del epitelio y son las responsables de secretar la mayoría de las proteínas que son secretadas en el lumen del epidídimo. Por su parte, las células estrechas, apicales y células de Halo contienen al (H⁺)-ATPasa vacuolar y secretan protones en el lumen del epidídimo, con lo que participan en la acidificación de este, las funciones que poseen las células claras son las de ser células endocíticas y se les atribuye la reabsorción y eliminación de las proteínas presentes en el lumen del epidídimo (Cornwall., 2009; Kujala et al., 2007; Pietrement et al., 2006). Las células basales no tienen acceso al compartimento luminal y están en estrecha asociación con las células principales superpuestas, las funciones que tienen estas células es de brindar protección y la regulación del transporte de electrolitos de las células principales mediante factores paracrinos (Cheung et al., 2005; Seiler et al., 1999; Veri, Hermo, Robaire., 1993). Las células de Halo tienen una función inmune primaria en el epidídimo, mientras que las células apicales también tienen una función de endocitar componentes lumbinales (Cheung et al., 2005). Finalmente, las células principales también forman uniones estrechas entre sí y forman la barrera hemato – epidídima. Esta barrera crea un sitio inmunoprotector dentro del lumen del epidídimo que es necesario para la maduración del espermatozoide (Cyr et al., 2007).

Transporte de espermatozoides.

Los espermatozoides entran al epidídimo propulsados por el líquido testicular. En el epidídimo el epitelio está revestido por estereocilios inmóviles y la absorción del líquido testicular tiene lugar en los túbulos eferentes y el segmento inicial del epidídimo reduce el flujo de los fluidos. El transporte de los espermatozoides se lleva a cabo en contra de un gradiente de presión hidrostática creciente del testículo a la cola del epidídimo (Robaire, Hinton, Orgebin-Crist., 2006).

El epidídimo está rodeado por musculo liso por lo que el mecanismo responsable de la conducción del contenido a través del lumen del epidídimo se atribuye principalmente a las contracciones musculares rítmicas del musculo liso, aunque estos se pueden ver alterados por factores hormonales y neuronales (Robaire, Hinton, Orgebin-Crist., 2006; Jaakkola, 1983).

Maduración de espermatozoides en el epidídimo.

La maduración espermática está definida como el desarrollo de la habilidad del espermatozoide para fertilizar ovocitos, para lograr esto, durante su paso por el epidídimo el espermatozoide desarrolla su motilidad, la habilidad de realizar la reacción acrosomal, modifica su morfología, estabiliza la cromatina nuclear, altera la composición de su membrana y adquiere la habilidad de reconocer, unirse y fusionarse con los ovocitos. (Cooper., 2007; Moore., 1998).

Uno de los cambios morfológicos visibles es la migración de la gota citoplasmática, un remanente del citoplasma de células germinales. Esta estructura se desliza desde el principio hasta el final de la pieza intermedia de los flagelos en la parte media de la cola del epidídimo. El transporte de esta gota se produce en el lumen, donde las secreciones de proteínas del epitelio son las más activas. La relación entre las funciones del epitelio y los mecanismos moleculares de tal modificación celular aún no se han identificado. Tal migración es una señal importante de la maduración del esperma, ya que cualquier defecto en la migración de las gotas está relacionado con una disminución en la fertilidad del semen, pero no a la activación de la motilidad del esperma en el epidídimo (Decheaux, Decheaux., 2014; Cooper 2005).

La membrana plasmática del espermatozoide se modifica durante el tránsito con cambios en los niveles de colesterol, ya que estos disminuyen. Los lípidos y las proteínas se reorganizan durante la maduración, posiblemente, permitiendo la formación de complejos de señalización críticos para la fertilización. Los lípidos

pueden funcionar como grandes conjuntos de señalización multimoleculares que reorganizados y agregados durante la capacitación inducen cascadas de señalización (Jones et al., 2007; Shadan et al., 2004; Croos., 2004; Travis et al., 2001).

Durante el paso de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo a la cola, existen modificaciones a las proteínas presentes en los espermatozoides tales como la fosforilación que afecta a proteínas como: proteína reguladora de glucosa, proteína de choque térmico 70, actina, β tubulina, deshidrogenasa del ácido láctico, proteína aconitasa mitocondrial y la subunidad β F1 ATPasa (Aitken et al., 2007); otra alteración que sufren las proteínas de los espermatozoides es la desglicosilación tales como: proteínas de la familia ADAM (fertilina y cyritestina), CE9, α -manosidasa; y algunas otras proteínas como SPAM1 y β - galactositransferasa sufren cambios en sus patrones de localización (Cornwall., 2009).

Movilidad espermática.

La motilidad, es el cambio más visible y cuantificable que sufre el espermatozoide al pasar por el epidídimo, ya que al iniciar su tránsito por la cabeza del epidídimo la mayoría de espermatozoides de mamíferos se caracteriza por tener un ritmo vibratorio o lento el cual es ineficaz, este tipo de movimiento a menudo se traduce en patrones circulares de natación; mientras que espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo se caracterizan por tener un ritmo de movimiento más vigoroso, el cual tienen como resultado un movimiento rápido hacia adelante al cual se le refiere como motilidad progresiva, este cambio de motilidad viene dado a un cambio en el flagelo, el cual llega a ser más rígido y reduce su arco de curvatura (Eddy., 2006).

La inobilina, una glicoproteína de alto peso molecular presente en el fluido epidídimo, ha sido descrita como un mecanismo inhibidor de la motilidad espermática, la cual ha sido reportada en bovinos y ratas (Eddy., 2006), por lo que, en los mamíferos la motilidad espermática en el epidídimo esta balanceada

entre dos importantes componentes: uno referente a la maquinaria flagelar que produce el movimiento, y el otro el control o represión de la maquinaria flagelar (Decheaux, Decheaux., 2014).

La motilidad de los espermatozoides maduros es dependiente del cAMP intracelular generado por el adenilato ciclasa y subsiguientes fosforilaciones de proteínas, entre las que se encuentra la proteína quinasa A (PKA) (Turner,. 2006). El mecanismo que se propone para que la PKA controle la función flagelar es mediante la fosforilación de la serina/treonina de la PKA, esto resulta en la activación de la tirosina quinasa (Fig. 6), la cual tiene como objetivo la fosforilación y está localizada en el flagelo (Si, Olds-Clarke,. 2000; Leclerc, Lamirande, Gagnon,. 1996), uno de los blancos de la tirosina quinasa en la dineína presente en el axonema, proteína considerada como esencial para la iniciación del movimiento flagelar (Tash, Bracho., 1998)

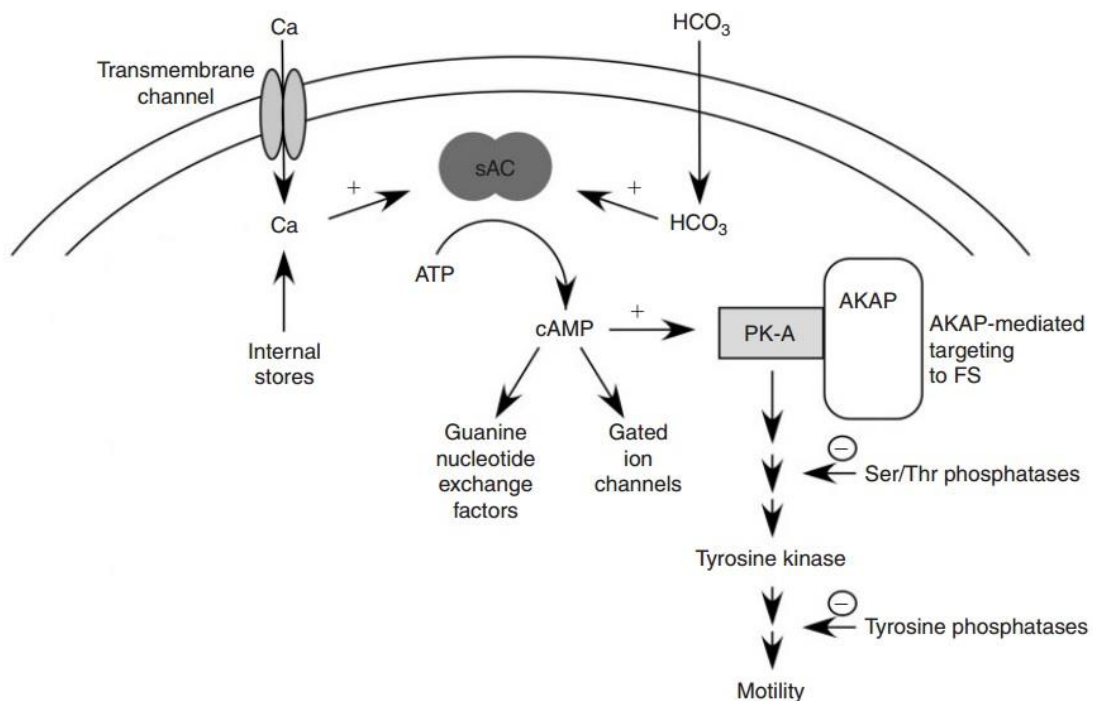


Fig. 6. Representación esquemática de la vía de señalización del cAMP, la cual regula la movilidad espermática en mamíferos. Modificado de Turner. 2006.

La presencia de serina/treonina fosfatasas en el proceso de activación del movimiento flagelar es debido a que balancean a las serina/treonina quinasas. El resultado de la fosforilación total de proteínas es un factor altamente influyente en la motilidad espermática (Tash, Bracho,. 1994; Tash,. 1989).

Además de la regulación de la vía PKA, el cAMP también puede activar otras vías de señalización en los espermatozoides, incluyendo el canal iónico de nucleótido cerrado y/o factor intercambiador de nucleótido de guanina mediado por cAMP (Turner,. 2006; Fig. 6).

La fosforilación y desfosforilación de tirosina de las proteínas del flagelo también se ha relacionado con el inicio y el final de la motilidad del esperma hiperactivado en primates y roedores (Si, Okuno,. 1999; Mahony, Gwathmey,. 1999; Chan et al. 1998). Una de estas proteínas que contienen fosfotirosina es una proteína de anclaje, la A-quinasa o AKAP (Si. 1999). Las AKAPs son una familia de proteínas responsables de anclar a las PKA y a otras proteínas en localizaciones subcelulares específicas (Scott et al. 2000).

Durante el tránsito en el epidídimo, los niveles de cAMP intracelular de los espermatozoides incrementan del cuerpo a la cola (Pariset et al. 1985, Decheux, Paquignon,. 1980, Hoskins, Stephens, Hall,. 1974), así como la capacidad metabólica y la producción del ATP (Inskeep, Hammerstedt,. 1982). La producción de cAMP es generado por el adenilato ciclasa de dominio transmembranal (AC) y el adenilato ciclasa soluble (sAC ; Wandernoth et al. 2010, Okamaru et al. 1985), el sAC se encuentra localizado a lo largo de la pieza media del espermatozoide y aporta mayores cantidades de cAMP que el adenilato ciclasa transmembranal debido a que es independiente a proteína G (Hess et al. 2005, Olivera et al. 2006) y simplemente es regulado por bicarbonato (HCO_3) y el calcio (Ca) los cuales ingresan a la célula mediante el cotransportador Na/HCO_3 y los canales catiónicos específicos del esperma (CatSper; Buck et al. 1999, Xie et al. 2006, Olivera et al. 2006).

Antecedentes.

La pentoxifilina (PTX) es un derivado de la metilxantina, es un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa del cAMP, aumenta la concentración intracelular de este último, además tiene propiedades anti-inflamatorias, reduce los aniones superóxido e inhibe al TNF- α , el cual es responsable de la fragmentación del ADN (Queiroz et al. 2013; Stanic, Sonicki, Suchanek,. 2002). La PTX es considerado un potenciador del movimiento espermático, agente hiperactivador, inhibidor de la formación de especies reactivas de oxígeno y un agente que mejora la reacción acrosomal (Stanic, Sonicki, Suchanek,. 2002), se usa en Reproducción Asistida para el tratamiento de los espermatozoides en las Técnicas como la inseminación intrauterina, fertilización *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática (Terriou et al . 2000).

Shen y colaboradores (1991), evaluaron el efecto que tiene la pentoxifilina en espermatozoides de humano tanto en pacientes catalogados normozoospermicos así como astenozoospermicos, esto bajo 2 tratamientos diferentes: administración *in vitro* y administración oral por un periodo de 3 meses. Determinaron que la adición *in vitro* de este fármaco beneficia la motilidad de los espermatozoides de pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos. Posterior a esto evaluaron el efecto de la administración oral de pentoxifilina por 3 meses sobre la movilidad de espermatozoides, llegaron a la conclusión que la ingesta de este medicamento no tiene efecto sobre este parámetro, pero si incrementa el porcentaje de células que tienen un movilidad progresiva.

La pentoxifilina y la cafeína han sido adicionadas *in vitro* a muestras de semen de personas que presentan lesiones en medula espinal y que perdieron la sensibilidad en algunas regiones de su cuerpo (Sikka y Hellstrom, 1991), en estos casos los espermatozoides son obtenidas por electro eyaculación, procedimiento que disminuye la movilidad espermática. Los resultados de este análisis demuestran que tanto la PTX como la cafeína mejoran significativamente el

porcentaje de motilidad espermática, sin embargo, en tiempos de incubación largos (4.5 horas) la cafeína demuestra mantener sus efectos en dosis bajas (0.1 mM), mientras que la pentoxifilina los mantiene bajo la administración de dosis altas (3.0 mM). En el mismo estudio se observa que la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides solo se ve afectada de manera positiva por la PTX en dosis de 3.0 mM, mientras que la cafeína tiene estos efectos desde concentraciones de 0.1 mM.

Stachecki, Ginsburg y Armant (1994) evaluaron el efecto que tiene el uso de la cafeína, la pentoxifilina y el 2'-deoxyadenosina sobre las características cinemáticas de los espermatozoides de cola de epidídimo del gato doméstico, tanto en fresco como criopreservados. La cafeína demuestra tener efectos negativos sobre la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides en dosis altas (10 y 20 mM) ya que dicha característica se ve disminuida, mientras que la PTX y la 2'-deoxyadenosina no tuvieron efecto alguno sobre la velocidad de desplazamiento y la motilidad total. Finalmente se demostró que los tres fármacos tienen efectos positivos sobre la motilidad y la velocidad curvilínea de espermatozoides crio preservados.

Se ha determinado que la pentoxifilina no tiene efectos sobre la movilidad de los espermatozoides de cabeza epidídimo de hámster dorado (Jayaprakash et al, 1997), además de que estos efectos no están relacionados con los diferentes medios que son utilizados para la obtención y preservación de dichas células, así mismo, se demostró que los análisis computarizados para la evolución de estas características influyen levemente en los resultados arrojados, esto con la comparación de datos obtenidos de manera manual. Finalmente, a pesar de no presentar diferencias en el porcentaje de la motilidad de espermatozoides, se demostró que la pentoxifilina si influye sobre la velocidad de desplazamiento. Otros autores que han evaluado el efecto de la Pentoxifilina sobre la movilidad de

espermatozoides de cauda de epidídimo son Wade y colaboradores (2003), quienes utilizaron espermatozoides de rata y lo compararon con el efecto de Ca^{2+} y dibutil cAMP, los resultados de este experimentos demuestran que la pentoxifilina tiene un tiempo de 20 minutos para activar los espermatozoides y que el efecto se prolonga hasta los 60 minutos de incubación, posterior a este tiempo se pierde el efecto de activación de la PTX por su parte el Ca^{2+} tarda un menor tiempo para la activación de estas células pero su efecto es de menor duración, por su parte el dibutil cAMP tiene un menor tiempo de activación y su efecto es de mayor duración. Rashidi, Movahedin y Tiraihi (2004) también han trabajado con espermatozoides de cauda de epidídimo de ratones, ellos demostraron que las condiciones ambientales en que se encuentran los espermatozoides una vez obtenidos afecta directamente sobre el efecto de la pentoxifilina, sus resultados demuestran que a temperaturas de 37° y 4° C la pentoxifilina tiene un efecto positivo sobre la motilidad progresiva rápida de los espermatozoides, por otro lado, el mantener a las células a temperatura ambiente tiene un efecto negativo sobre la movilidad, ya que incrementa el porcentaje de espermatozoides inmóviles disminuyen los espermatozoides móviles lentos y móviles in situ. Hassanpour et al en 2010 demostraron que la pentoxifilina en dosis bajas (0.01 mM) es beneficioso para los espermatozoides de cauda de epidídimo de caballo, ya que incrementa la motilidad progresiva y la velocidad curvilínea de los espermatozoides, por su parte, las dosis altas (10 mM) afectan la movilidad espermática al disminuirla. Guasti et al (2013) demostraron que la pentoxifilina tiene efectos positivos en la motilidad total, motilidad progresiva y velocidad curvilínea en espermatozoides obtenidos de cauda de epidídimo de caballos, esto administrar la pentoxifilina y evaluar sus efectos de manera inmediata y después de 15 minutos de incubación.

En 1998 Calogero y colaboradores demostraron que la pentoxifilina aumenta los niveles de cAMP, el cual está estrechamente relacionado con la actividad motora de los espermatozoides, ellos encontraron que a tiempos de 1 y 2 horas de contacto con el fármaco, la concentración intracelular del cAMP de los espermatozoides aumenta, mientras que pasado 4 horas de contacto esta concentración empieza a disminuir. Al correlacionar las concentraciones de cAMP

intracelular con la actividad espermática, encontraron una relación directa entre el cAMP, la movilidad total y la velocidad curvilínea de los espermatozoides de eyaculado de humano.

En 1998, Tasdemir, Tasdemir y Tavukcuoglu administraron pentoxifilina a una concentración de 3.6 mM a espermatozoides humanos inmóviles obtenidos de testículo, a los cuales tuvieron en incubación en periodos de 30, 60 y 90 minutos a una temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Los diferentes tratamientos tuvieron resultados positivos, obteniendo un incremento significativo en el porcentaje de movilidad.

Se ha demostrado que la pentoxifilina incrementa el tiempo en que los espermatozoides presentan movilidad, ya que Kinutani (1999) logro mantener intacto este parámetro hasta por 300 minutos al suministrar pentoxifilina a espermatozoides normozoospermicos, sin embargo, también observo que la pentoxifilina incrementa la velocidad curvilínea en un lapso de tiempo de 30 a 120 minutos, después de ese periodo de tiempo la velocidad disminuye drásticamente.

En el año 2000 Gradil y Ball evaluaron los efectos que tiene la pentoxifilina sobre la motilidad espermática al ser añadida previa y posteriormente a un proceso de criopreservación, sus resultados demostraron que los tratamientos de PTX añadidos posterior al descongelamiento de la muestra tienen un efecto positivo en el porcentaje de motilidad total, por su parte las muestras a las que se les añadió el tratamiento previo al proceso de criopreservación tuvieron un efecto negativo, ya que hubo una disminución en el porcentaje de motilidad total. Al analizar el porcentaje de motilidad progresiva los resultados indican la misma tendencia que los resultados de motilidad total, siendo que los tratamientos añadidos posterior a un tratamiento de criopreservación y descongelación aumento la motilidad

progresiva, mientras que las muestras que recibieron tratamiento previo al proceso de criopreservación y descongelación sufren un decremento en el porcentaje de motilidad progresiva

Se ha medido el efecto de activación de la pentoxifilina en una población de espermatozoides con un porcentaje de movilidad del 0% provenientes de testículo y epidídimo de humano, los resultados demuestran que espermatozoides de epidídimo presentan una viabilidad del 29.2% y una tasa de activación del 14.8%, por su parte los espermatozoides de testículo tienen una viabilidad del 33.6% y un porcentaje de activación del 13.6% (Terriou et al, 2000).

Stanic, Sonicki y Suchanek (2002) valoraron el efecto de la pentoxifilina en la motilidad en espermatozoides crio preservados de pacientes normospermicos. Para esto, añadieron pentoxifilina 3 mM a 3 grupos experimentales: administración de farmaco a muestras recién obtenidas y criopreservadas, pentoxifilina como auxiliar del crioprotector y al último se le adiciono la pentoxifilina una vez que las muestras fueron descongeladas; para el grupo control no se utilizó pentoxifilina. El primer grupo experimental tuvo una disminución en la motilidad total y progresiva comparada con el grupo control, solamente el grupo al que se le adiciono la pentoxifilina después de ser descongelados mostraron un aumento significativo en el porcentaje de motilidad total y progresiva.

Se ha demostrado que la administración diaria de pentoxifilina durante cierto periodo a hombres astenozoospermicos aumenta el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida, además tiene los mismos efectos benéficos en hombres con varicocele testicular y la edad del individuo no es un factor que influya sobre el efecto del fármaco (Moein, Khalili, Davoudi., 2005).

Gil et al (2010) determinaron que la pentoxifilina tiene un efecto benéfico en espermatozoides de eyaculado de jabalí negro, esto a partir de un tratamiento de las células a una concentración de 2 mM hasta 32 mM, además, encontraron que el tiempo de incubación de espermatozoides con pentoxifilina es un factor importante, ya que a mayor tiempo de incubación, son las mayores concentraciones del fármaco las que tienen un efecto positivo en la movilidad. Al evaluar el efecto del fármaco en espermatozoides criopreservados con una administración previa al congelamiento y posterior a este, muestran que su administración antes del proceso de congelación beneficia al porcentaje de motilidad total y de motilidad progresiva rápida mientras que su administración después del proceso de congelación solo es beneficiosa para aumentar el porcentaje de motilidad total.

Justificación.

Para la fertilización de los ovocitos uno de los factores que cobra gran importancia es la motilidad espermática, es decir, la capacidad que presentan los espermatozoides de trasladarse a través de su medio. Durante los últimos años se ha recurrido a la adición de estimulantes de motilidad para poder combatir problemas de espermatozoides con un bajo índice de motilidad, uno de los más utilizados en la actualidad es la pentoxifilina, además, este fármaco ha sido utilizado para medir la viabilidad de espermatozoides inmóviles que serán utilizados en técnicas de reproducción asistida como la ICSI. A pesar de que pentoxifilina es ampliamente usada para la activación espermática, su uso se ha limitado solamente para muestras de espermatozoides eyaculados, extraídos de testículo en humanos y más recientemente de espermatozoides obtenidos de epidídimo en humano y en el caso de roedores y caballo de la cauda del

epidídimo, sin embargo no se ha documentado si este fármaco tiene efecto alguno sobre espermatozoides de cabeza y cuerpo del epidídimo, es por eso que se propone el analizar si hay algún efecto positivo para la motilidad de estos espermatozoides, ya que estos podrían ser una fuente de células capaces de fertilizar ovocitos.

Hipótesis.

La administración de pentoxifilina a espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones de epidídimo de rata estimula la motilidad espermática así como la velocidad de desplazamiento de estas células.

Objetivo General:

Evaluar el efecto que tiene la pentoxifilina sobre la movilidad y velocidad de desplazamiento de los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo de rata.

Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto que tiene la incubación con Pentoxifilina a concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 5 mM sobre la velocidad curvilínea de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo de rata.

- Evaluar el efecto que tiene la administración de Pentoxilina en dosis de 0.01, 0.1, 1 y 5 mM sobre la motilidad progresiva, in situ y total de los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo de rata.

Material y Métodos.

Fueron utilizadas 20 ratas macho de la cepa Long-Evans de 10 semanas de edad, con las cuales se realizaron 10 experimentos con 2 ratas cada uno.

Las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico, para ello se les administro 1 ml de dicho fármaco vía intraperitoneal, después de 20 minutos se verificaba la muerte del animal. Posteriormente se colocaba en una cama de disección, se le realizaba una incisión horizontal en la parte baja de la zona abdominal, una vez que se dejaban expuestas las vísceras los testículos eran empujados desde el escroto con ayuda de los dedos a la región abdominal, una vez que se observaban los testículos se identificaban los epidídimos y estos fueron separados.

Una vez que los epidídimos eran aislados de los testículos se les retiraba cualquier residuo de tejido graso que pudiera quedar pegado a estos y eran colocados en solución mR1ECM (anexo A) a 37° C para eliminar cualquier resto de sangre, posteriormente se identificaban las tres regiones del epidídimo y estas eran separadas. Para obtener los espermatozoides de cabeza de epidídimo el tejido era cortado y depositado en un tubo cónico graduado, este procedimiento se hacía con las cabezas de epidídimo obtenidas de los 2 testículos de los 2 animales. Posterior a esto último, al tejido se le adicionaba 2 ml de solución mR1ECM a 37° C y el tubo era agitado levemente hasta que la solución obtuviera una coloración blanca, inmediatamente por decantación se separaba la solución del tejido en otro tubo cónico plástico, el cual era colocado en un baño María a 37°C. Este mismo procedimiento se siguió para obtener los espermatozoides de cuerpo y cola de epidídimo.

Concentración espermática.

Una vez que se obtuvieron los espermatozoides se determinó la concentración espermática, para esto se realizó una disolución de 50 μl de la suspensión de espermatozoides y 450 μl de solución de conteo (Anexo A) en un tubo cónico. La disolución se homogenizó mediante una ligera agitación, se tomó una alícuota de 10 μl para llenar la cámara del hemocitometro, la muestra se dejó por tres minutos a temperatura ambiente para permitir que la muestra se sedimentara. Posteriormente, se enfocó la cuadrícula central del hemocitometro con un aumento de 40x, la cual está dividida en 25 cuadrículas más pequeñas que a su vez están divididas en 16 cuadros. Para obtener la concentración espermática se inicia por contar el número de espermatozoides presentes en el primer cuadro superior izquierdo de la cámara, de acuerdo al número de espermatozoides obtenidos en el primer cuadro superior izquierdo se determina el número total de cuadros a contar, esto en base a la Tabla 1.

Número de espermatozoides encontrados en el cuadro superior izquierdo	Numero de cuadros a evaluar del cuadro central del Hemocitometro.
< 10 Espermatozoides	25 cuadros
10-40 Espermatozoides	10 cuadros
<40 Espermatozoides	5 cuadros

Tabla 1. Relación de espermatozoides contados en el primer cuadro superior izquierdo del hemocitometro con respecto al número de cuadros a contar de los 25 que forman la cuadrícula central.

La concentración de espermatozoides se expresa en millones/ml. Para esto se divide la cantidad de espermatozoides contados por el factor de conversión correspondiente (Tabla 2). Para obtener la cuenta total de espermatozoides se multiplica el volumen total de la suspensión de espermatozoides por la

concentración espermática por mililitro. El procedimiento para obtener la concentración espermática se realizó de igual manera para las muestras de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo.

Disolución utilizada	Numero de cuadros contados		
	25 cuadros	10 cuadros	5 cuadros
1:10 (1+9)	10	4	2

Tabla 2. Factores de conversión, para obtener el número de espermatozoides por mL de la suspensión de espermatozoides.

Se experimentaron 4 concentraciones diferentes de pentoxifilina (Trental 300mg, Sanofi Aventis) por 1 millón de espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo: 0.01, 0.1, 1.0 y 5.0 mM. Para el grupo control solo se uso solución mR1ECM en el mismo volumen que con las células tratadas con Pentoxifilina. Todas las muestras fueran incubadas por 15 minutos en baño María a una temperatura de 37° C.

Una vez que el tiempo de incubación se había completado, se tomaron en alícuotas de 10 µl y fueron colocados en un portaobjetos al que se le colocó un cubre objetos de 22 x 22 mm, las muestras fueros observadas en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100 el cual tenía acoplado una cámara SCienon ISH500 de 5.0 MP con un adaptador al ocular con un aumento de 0.45x, las muestras fueron observadas con un objetivo de 10x y se video grabó la actividad espermática con ayuda del programa ISCapture. Se grabaron dos campos al azar por cada uno de los grupos experimentales y el control de cada una de las regiones del epidídimo, el software fue programado para que realizara videos de

30 segundos. Estos últimos fueron posteriormente analizados para determinar la velocidad curvilínea (VCL) y la motilidad progresiva espermática.

Determinación velocidad curvilínea.

Para la determinación de la velocidad curvilínea fueron seleccionados espermatozoides con las siguientes características:

- Presentaran movilidad progresiva.
- Estuvieran en el campo visual durante todo el video.
- No presentaran obstrucciones (burbujas de aire, restos de tejido, aglomeraciones de células) que disminuyeran su velocidad o que los detuvieran.

Una vez identificados los espermatozoides viables para la evaluación de velocidad, con ayuda del programa Tracker se analizó el cambio de posición del espermatozoide cuadro por cuadro (Fig. 7) para posteriormente trazar una línea con la trayectoria del espermatozoide (Fig. 7).

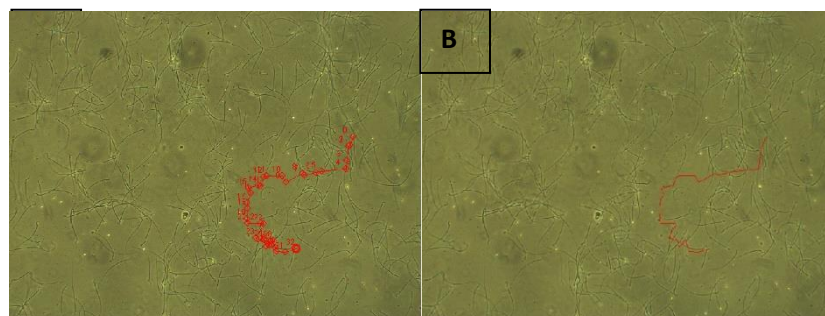


Fig. 7. Fotografías de microscopía óptica que muestran el uso del programa Tracker para la determinación del recorrido del espermatozoide. A) Determinación de la posición del espermatozoide a cada cuadro del video y trazado del recorrido del espermatozoide. B) Eliminación de la posición del espermatozoide, dejando únicamente la línea de recorrido.

Una vez que se obtuvieron las líneas de recorrido de los espermatozoides, se exportaron como imágenes JPG para realizar el análisis de la velocidad espermática, esto se llevó a cabo en el programa ISCapture, midiendo la longitud de la línea de recorrido, para evitar que el cambio de un formato a otro provocara cambio alguno en la exactitud de la medición, la imagen de calibración para el programa ISCaptures también fu enviada al programa Tracker y exportada como imagen JPG. Una vez que se obtuvieron las longitudes de desplazamiento de los espermatozoides, se utilizó la fórmula: $V= d/t$, siendo que el tiempo que se utilizo fue el tiempo real de 30 segundos.

Determinación de motilidad espermática.

Para determinar el porcentaje de movilidad espermática se observaron los videos y se le asignó a cada espermatozoide una categoría, siendo: Espermatozoides con motilidad progresiva aquellos que se desplazan activamente, tanto linealmente como en un gran círculo, independientemente de la velocidad; espermatozoides con motilidad *in situ* aquellos que presentan un patrón de movimiento con ausencia de progresión; y espermatozoides inmóviles aquellos que no presentan ningún tipo de movimiento.

Una vez que se obtiene el total de espermatozoides en cada una de las características se obtiene el porcentaje en base al total de espermatozoides por campo, además se hace la suma de espermatozoides móviles progresivos e *in situ*, para determinar la motilidad total.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante el Software de análisis de datos R CRAN en la versión 3.2.0.

Velocidad Curvilínea.

Se determinó la normalidad de los datos, esto mediante un análisis de Shapiro Wilk, tomando un resultado de $P > 0.05$ como muestras normales, el análisis realizado arrojó un valor de $P < 0.05$, posterior a este análisis se realizó una normalización de los datos mediante la obtención del logaritmo natural de los datos, posteriormente se volvió a realizar el análisis de Shapiro Wilk bajo los mismos criterios, obteniendo un valor de $P < 0.05$, nuevamente se realizó una normalización de los datos, en esta ocasión mediante la obtención de la raíz cuadrada de los datos, nuevamente el análisis de Shapiro Wil arrojó un resultado de no normalidad, esta tendencia obedeció en los datos de cabeza, cuerpo y colas.

Una vez que los datos fueron catalogados como no paramétricos o no normales, se realizó una prueba Kruskal Wallis para buscar diferencias entre los diferentes grupos, tomando como diferencias significativas aquellos resultados con un valor de $p < 0.05$, este análisis se realizó a las diferentes muestras de velocidad espermática (Cabeza, cuerpo y cola de epidídimo).

Motilidad.

Se determinó la normalidad de los datos mediante un análisis de Shapiro Wilk, tomando un resultado de $p > 0.05$ como muestras normales, el análisis realizado demostró que los datos de motilidad espermática de cabeza, cuerpo y cola eran normales.

Posteriormente se realizó una prueba ANOVA para buscar diferencias entre los diferentes grupos y se tomó un valor de $p < 0.05$ como significativo. Para los resultados que mostraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) de los grupos experimentales con su control, no se tomaron

en cuenta las diferencias entre los grupos experimentales, ya que la finalidad del experimento fue conocer bajo que tratamiento existía una activación en comparación de las células con ausencia del fármaco.

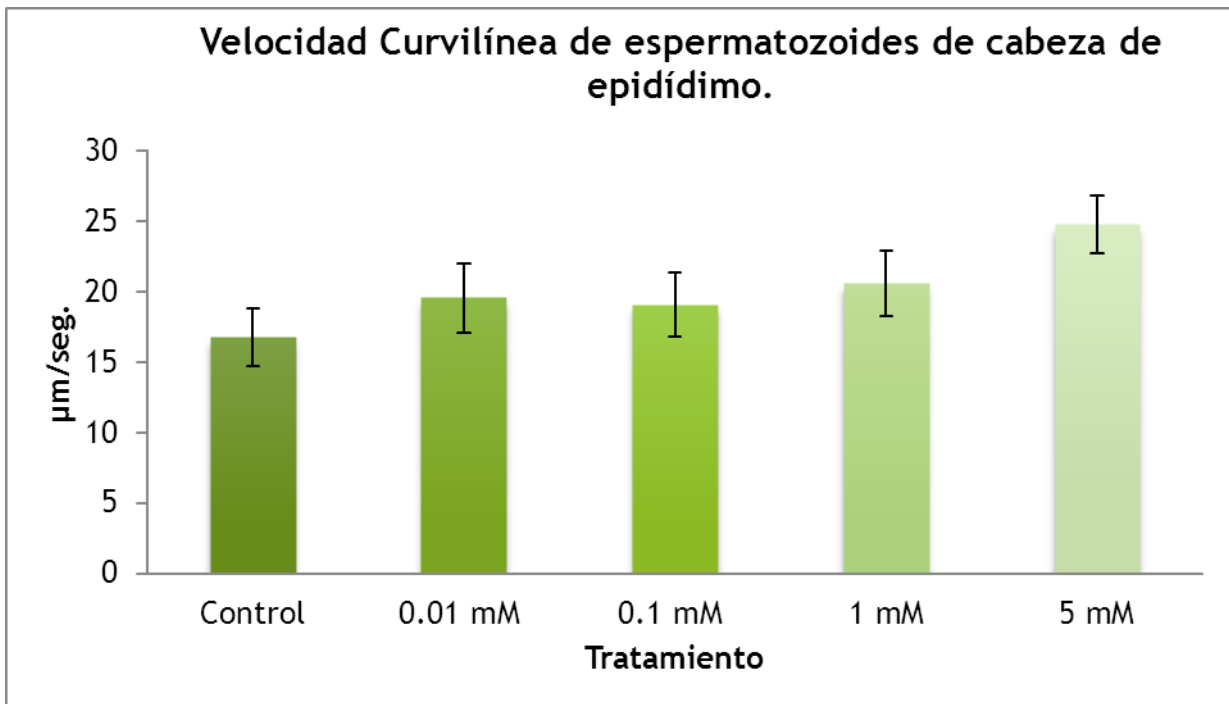
Resultados.

El promedio de células obtenidas por experimento de cabeza de epidídimo fue de 204.9×10^6 células por mililitro, en cuerpo de epidídimo se obtuvo un promedio de 101.3×10^6 células,

Velocidad Curvilínea.

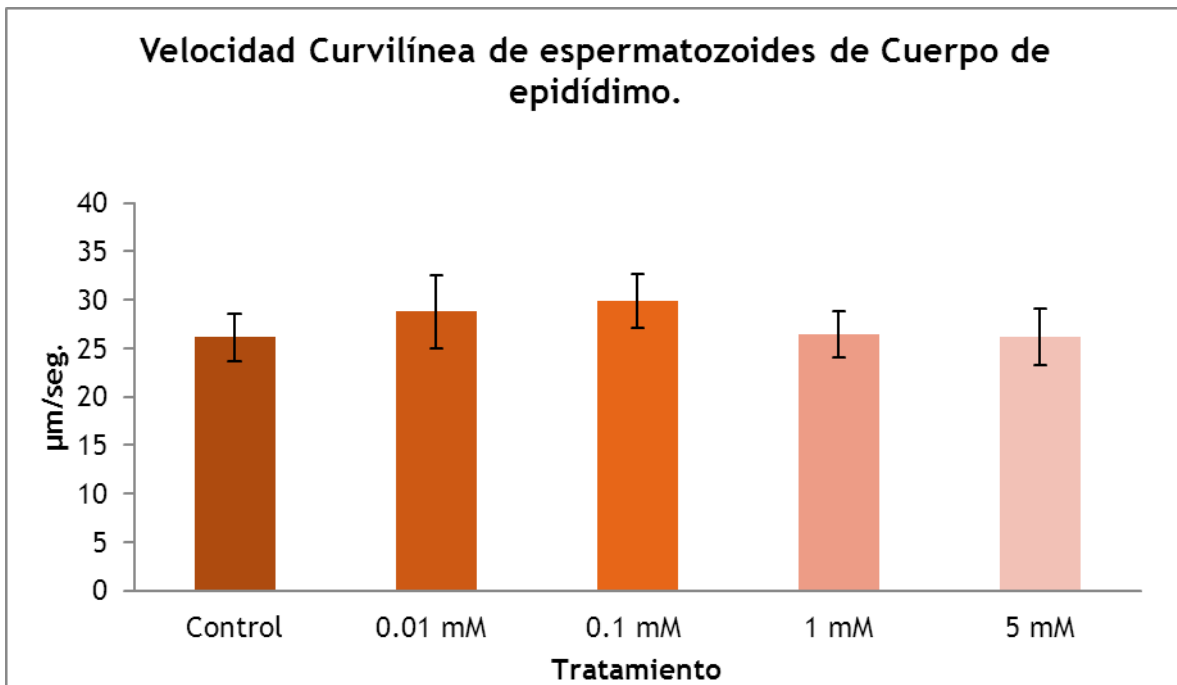
Para determinar la velocidad curvilínea se analizaron 10 espermatozoides por cada uno de los grupos de las diferentes regiones del epidídimo por experimento.

La velocidad promedio que presentaron los espermatozoides de cabeza de epidídimo del grupo control después de 15 minutos de incubación a 37°C es de $16.7 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.0$. Los espermatozoides incubados en la presencia de pentoxifilina mostraron un aumento en la velocidad curvilínea promedio. Las células tratadas a una concentración de 0.01 y 0.1 mM presentaron una velocidad promedio de $19.5 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.4$ y $19.1 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.3$ respectivamente. El tratamiento con una dosis de 1 mM eleva la velocidad promedio de los espermatozoides a $20.5 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.3$ y finalmente los espermatozoides tratados con una dosis de 5 mM de pentoxifilina presentaron una velocidad media de $24.7 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.0$. Se observa que a mayor concentración de pentoxifilina la velocidad incrementa, sin embargo, a pesar de esta tendencia no existieron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos (Grafica 1).



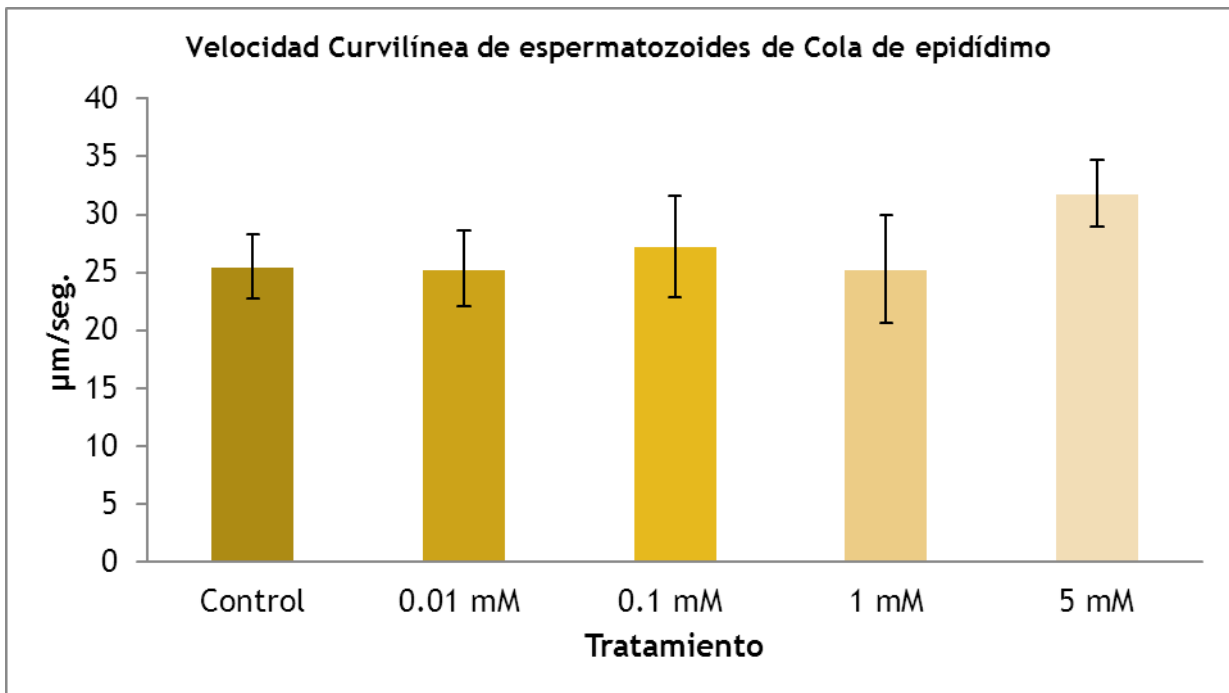
Grafica 1. Grafica que representa la media \pm E.E. de la velocidad de desplazamiento de espermatozoides de cabeza de epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina ($p > 0.05$, Análisis de Kruskal-Wallis).

Por su parte, la velocidad promedio de los espermatozoides de cuerpo de epidídimo del grupo control es de $26.1 \mu\text{m/seg} \pm 2.3$. Las células tratadas a una concentración de 0.01 y 0.1 mM presentaron una velocidad promedio de $28.7 \mu\text{m/seg} \pm 3.7$ y $29.9 \mu\text{m/seg} \pm 2.7$ respectivamente. El tratamiento con una dosis de 1mM presenta una velocidad promedio de $26.4 \mu\text{m/seg} \pm 2.3$, finalmente los espermatozoides tratados con una concentración de pentoxifilina de 5 mM presentaron una velocidad promedio de $26.1 \mu\text{m/seg} \pm 2.9$. Se observa que en concentraciones de 0.01 y 0.1 mM de pentoxifilina la velocidad de las células incrementa, sin embargo, no existieron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos (Grafica 2).



Grafica 2. Grafica que representa la media \pm E.E. de la velocidad de desplazamiento de espermatozoides de cuerpose epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina ($p > 0.05$, Análisis de Kruskal-Wallis).

Los espermatozoides de cola de epidídimo del grupo control después de 15 minutos de incubación con petoxifilina presentaron una velocidad promedio de $25.5 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.7$. Las células tratadas con concentraciones de pentoxifilina de 0.01 y 0.1 mM presentaron una velocidad de $25.3 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.7$ y $27.2 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 4.3$ respectivamente. Las células tratadas con pentoxifilina a una concentración de 1 mM tuvieron una velocidad de $25.2 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 4.6$, finalmente las células que tuvieron un tratamiento a una concentración de 5 mM presentaron una velocidad de $31.8 \mu\text{m}/\text{seg} \pm 2.8$. Las células tratadas con una concentración de 5mM de pentoxifilina presentaron un aumento de la velocidad media, sin embargo, el análisis estadístico no demuestra diferencias estadísticas significativas (Grafica 3).



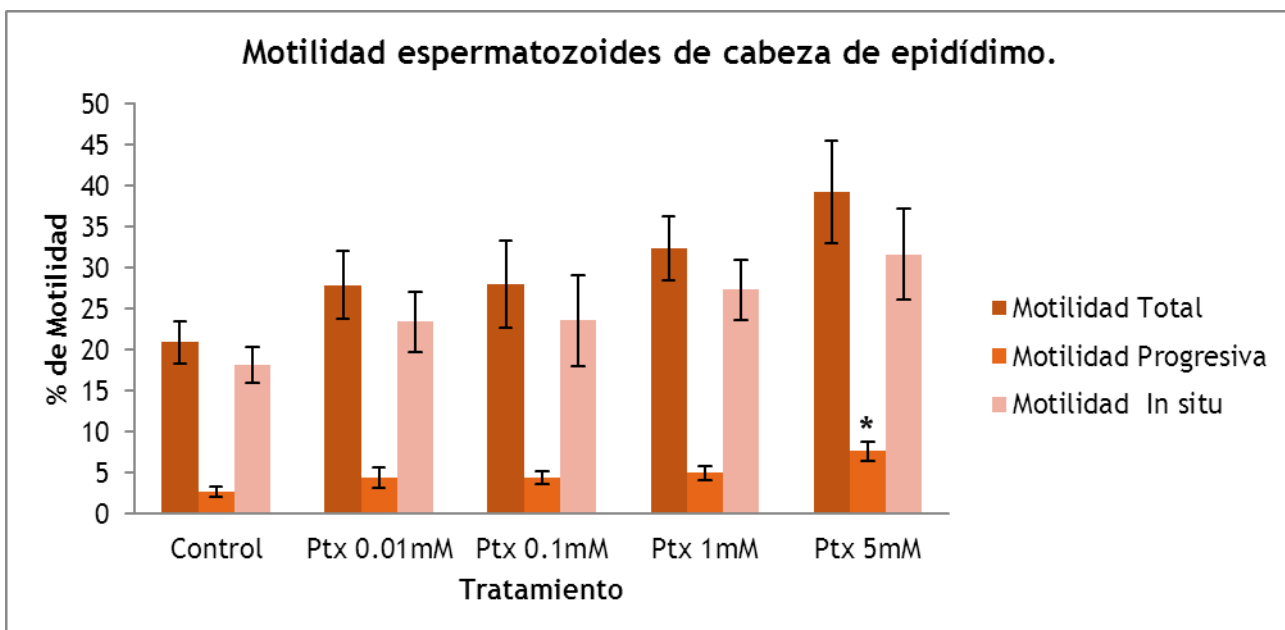
Grafica 3. Grafica que representa la media \pm E.E. de la velocidad de desplazamiento de espermatozoides de cola de epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina ($p > 0.05$, Análisis de Kruskal-Wallis).

Motilidad espermática.

Para el análisis de la motilidad espermática se realizó un conteo de 200 células por cada experimento.

Al evaluar la motilidad total de los espermatozoides de cabeza de epidídimo se observa un aumento en este parámetro conforme incrementa la concentración de pentoxifilina en el medio de incubación, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales con su respectivo grupo control. Esta misma tendencia se ve en la motilidad in situ, la cual de igual manera no presenta diferencias significativas. Finalmente al evaluar la velocidad progresiva, la cual se presenta en menor medida en comparación con la movilidad in situ, presenta el mismo patrón de desarrollo que los tres parámetros evaluados

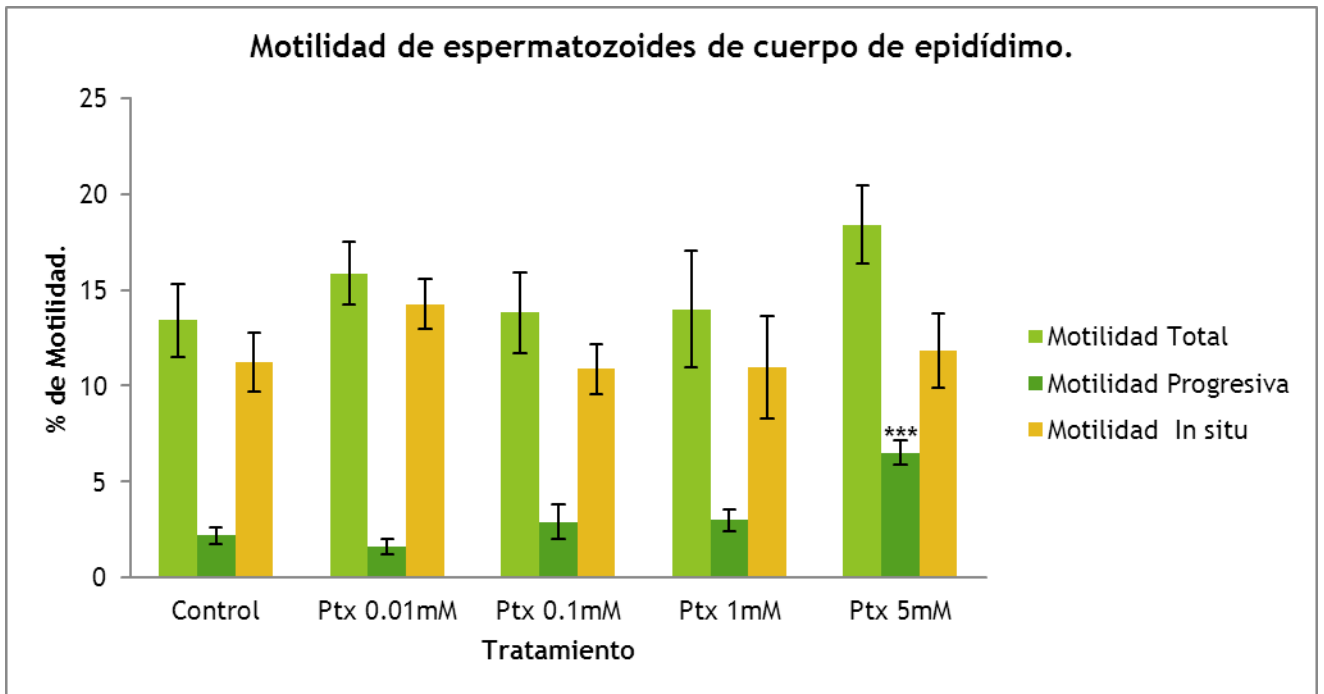
anteriormente, sin embargo el análisis estadístico demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental de pentoxifilina a una concentración de 5 mM comparado con el grupo control respectivo, la significancia obtenida fue de una $p < 0.05$ (Grafica 4).



Grafica 4. Grafica que representa la media \pm E.S. del porcentaje de espermatozoides de cabeza de epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina (* $P < 0.05$ comparada con el control respectivo, Análisis ANOVA).

Al evaluar la motilidad total de los espermatozoides de cuerpo de epidídimo se observa un aumento en este parámetro, siendo que el grupo con pentoxifilina a una concentración de 5 mM en el medio de incubación tienen el mayor aumento, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales con su respectivo grupo control. En la motilidad in situ la presencia del fármaco presenta un aumento el porcentaje de este parámetro, siendo que la concentración de 0.01 mM presenta el mayor aumento, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas. Finalmente al evaluar la velocidad progresiva, la cual se presenta en menor medida en comparación con la movilidad in situ, presenta un patrón de aumento de este

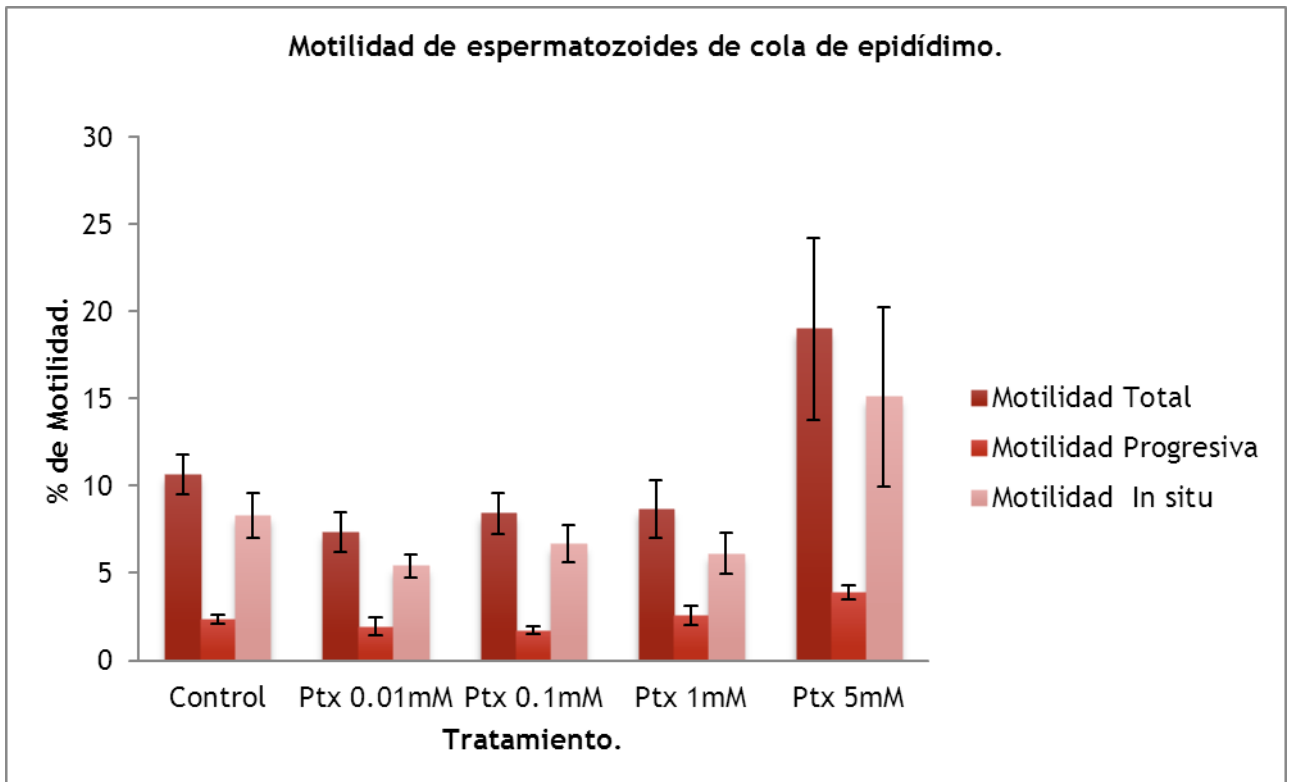
parámetro conforme aumenta la concentración de la pentoxifilina a partir del grupo con concentración de 0.1 mM, el análisis estadístico demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental de pentoxifilina a una concentración de 5 mM comparado con el grupo control respectivo, la significancia obtenida fue de una $p < 0.001$ (Grafica 5).



Grafica 5. Grafica que representa la media \pm E.E. del porcentaje de espermatozoides de cuerpo de epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina (***) $p < 0.001$ comparada con el control respectivo, Análisis ANOVA).

Al evaluar la motilidad total de los espermatozoides de cola de epidídimo se observa un decremento en este parámetro con los grupos experimentales, solamente el grupo de incubación a concentración de 5 mM de pentoxifilina presenta un aumento en comparación con el grupo control respectivo, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales con su respectivo grupo control. Esta misma tendencia se ve en la motilidad in situ, la cual de igual manera no presenta diferencias significativas. Finalmente al evaluar la velocidad progresiva, los grupo experimentales con una

concentración de 1 y 5 mM de pentoxifilina presenta un aumento en el porcentaje de este parámetro, sin embargo el análisis estadístico no demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales de pentoxifilina comparados con el grupo control respectivo (Grafica 6).



Grafica 6. Grafica que representa la media \pm E.E. del porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo de rata en el grupo control y tratados con pentoxifilina ($p > 0.05$, Análisis ANOVA).

Discusión.

En la actualidad, la implementación de estimuladores de actividad espermática como la pentoxifilina en las técnicas de reproducción asistida son utilizados para iniciar el movimiento de los espermatozoides obtenidos de testículo, los cuales carecen de movimiento, el uso de estos fármacos ayuda a seleccionar los espermatozoides metabólicamente activos mediante el inicio de la movilidad, de

esta manera se llega a discriminar entre espermatozoides vivos y muertos, esta técnica ha logrado aumentar tasa de éxito de técnicas como la inyección intracitoplasmática (ICSI; Tasdemir, 1998)

Se ha demostrado que el tiempo es un factor importante en la activación de la movilidad de espermatozoides de cauda de epidídimo de rata, ya que la pentoxifilina tiene un efecto transitorio en los niveles de cAMP, siendo que se ha demostrado que en periodos de incubación de 20 minutos estos niveles se encuentran al máximo y por lo tanto el efecto del fármaco sobre la motilidad de los espermatozoides está en su máxima expresión (Wade et al. 2003), nuestros resultados demuestran que en un tiempo de 15 minutos de incubación de los espermatozoides tratados con pentoxifilina es suficiente para la activación de la motilidad de espermatozoides de cabeza y cuerpo de epidídimo, pero no para los de cola.

Se ha establecido que los efectos benéficos de la pentoxifilina están directamente relacionados con el incremento del cAMP intracelular que este fármaco induce (Garbers, Kopf, 1980; Tash, Means, 1983; Ward, Clissold, 1983), aunque se ha propuesto que este no es el único mecanismo que puede provocar dichos efectos, ya que se ha observado que espermatozoides activados con pentoxifilina no siempre presentan niveles altos de cAMP e incluso han presentado un decremento de este último (Calogero et al. 1998).

Se ha propuesto que los efectos de la pentoxifilina son más eficientes entre mayor grado de inmadurez presenten las células (Tasdemir, Tasdemir, Tavukcuoglu, 1998.) siendo que esto concuerda con nuestros resultados, ya que los efectos más significativos en el porcentaje de incremento de la motilidad se ven en espermatozoides de cabeza de epidídimo seguido por las células provenientes de cuerpo de epidídimo, y las células con un mayor grado de madurez (cola de epidídimo) reflejan un menor grado de activación, así mismo, se logra observar que espermatozoides de cabeza de epidídimo tienen una tendencia de incrementar la velocidad en las diferentes dosis de pentoxifilina que fueron suministradas, esta tendencia va disminuyendo conforme los espermatozoides

avanzan en el tracto epidídimal. Se sabe que los efectos de la pentoxifilina pueden ser nulos si los espermatozoides en lo que son utilizados presentan defectos enzimáticos, en el axonema o en el flagelo espermático (Tasdemir, Tasdemir, Tavukcuoglu, 1998), pero no en el grado de madurez de las células.

Existe una gran controversia sobre los efectos de la pentoxifilina, ya que hay autores que sugieren que la pentoxifilina incrementan el número de espermatozoides con motilidad progresiva (Fuse et al. 1993; McKinney, Lewis, Thompson., 1994; Contola, Cartie, Cox., 1995), mientras hay quien contradice estas afirmaciones (Aparicio, Schwarztein, Turner., 1980; Yovich et al. 1990) y por otro lado se ha reportado que el efecto de la pentoxifilina es solamente sobre la velocidad de los espermatozoides (Tesarik, Thebault, Testart., 1992; Lewis, Moohan, Thompson., 1993; Pang, Chan, Lu., 1993; Tournaye et al. 1994), estas diferencias han sido atribuidas a los diferentes diseños experimentales, por los que las condiciones en las que se llevan a cabo los experimentos influyen en el resultado (Terriou et al. 2000), además de otros factores como el tiempo de incubación y principalmente la concentración de pentoxifilina, ya que este fármaco es un inhibidor inespecífico de la fosfodiesterasa, de la cual han sido descritas gran variedad de familias y de ellas, 6 han sido identificadas en los espermatozoides y cada una estimula diferentes funciones del espermatozoide, por lo que las variaciones anteriormente mencionadas pueden provocar que la pentoxifilina inhiba diferentes fosfodiesterasas y por lo tanto provoque la variación en los resultados que diversos autores han descrito (Fisch. 1998; Dimitriadis et al., 2008; Hassanpour et al., 2010).

Los resultados indican que la pentoxifilina también activa la movilidad de espermatozoides de cabeza y cuerpo de epidídimo, por lo que nos ayuda a determinar cuáles espermatozoides son metabólicamente activos y estos espermatozoides podrían ser utilizados para técnicas de reproducción asistida como el ICSI.

Conclusiones.

La pentoxifilina en concentraciones de 5 mM aumenta el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de cabeza de epidídimo.

La pentoxifilina en concentraciones de 5 mM aumenta el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de cuerpo de epidídimo.

La pentoxifilina bajo las condiciones manejadas no activa la motilidad de los espermatozoides de cola de epidídimo.

La pentoxifilina bajo las condiciones manejadas no altera la velocidad curvilínea de los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo.

La pentoxifilina nos permite activar espermatozoides de cabeza y cuerpo de epidídimo, por lo tanto nos permite seleccionar espermatozoides que son metabólicamente activos y seleccionar aquellos que son más aptos para la técnica ICSI.

Bibliografía.

Aitken R J, Nixon B, Lin M, Koppers A J, Lee Y H, Baker M A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology*, 9: 554-564.

Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5a Edition. Ed. Garland Science. U.S.A. pp 1269-1304.

Aparicio N J, Schwarzstein L, Turner E A. (1980). Pentoxifylline (BL 191) by oral administration in the treatment of asthenospermia. *Andrologia*, 12: 228-231.

Buck J, Sinclair M L, Schapal L, Cann M J, Levin L R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 79-84.

Calogero A E, Fishel S, Halla J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S, D'Agata R. (1998). Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*, 13: 911-915.

Chan P J, Corselli J U, Patton W C, Jacobson J D, King A. (1998). Enhanced fertility after heat-induced hyperactivation. *Fertility and sterility*, 69: 118-121.

Cheung K H, Leung GP, Leung M C, Shum W W, Zhou W L, Wong P Y. (2005). Cell-cell interaction underlines formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *The Journal of General Physiology*, 125: 443-454.

Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C. (2012). Spermatogenesis in mammals: proteomic insight. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58: 179-190.

Contola C M, Cartie R J, Cox C. (1995). Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifylline with demonstration of toxicity. *Journal of Andrology*, 16: 136-142.

Cooper T G. (2007). Sperm Maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*, 9: 533-539.

Cornwall G A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15: 213 -227.

Cross N L. (2004). Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of Reproduction*, 71: 1367-1373.

Cyr D G, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan P T, Hermo L. (2007). Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian Journal of Andrology*, 9: 463-475.

Dacheux J L, Dacheux F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147: 27-42.

Decheux J L, Paquignon M. (1980). Relations Between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reproduction, Nutrition, Development*, 20: 1085-1099.

Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Zikopoulos K, Paraskevaïdis E, Giotitsas N, Kalaboki V, Tsounapa P, Baltogiannis D, Georgiou I. (2008). Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian Journal of Andrology*, 10: 115-133.

Eddy E M. (2006). The spermatozoon. En: Neill J D, Challis J R G, Kretser D M, Pfaff D W, Richards J S, Plant T Z, Wassarman P M, (eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, vol. 1, 3rd Edition. Elsevier. U.S.A. pp 3-54.

Fawcett D. (1970). A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction Supplement*, 2: 90-127.

Fawcett D. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*, 44: 394-436.

Fisch J D. (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Human Reproduction*, 13: 1248-1254.

Fuse H, Sakamoto M, Ohta S, Katayama T. (1993). Effect of pentoxifylline on sperm motion. *Archives of Andrology*, 31: 9-15.

Garbers D L, Lust W D, First N L, Lardy H A. (1971). Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry*, 10: 1825-1831.

Gil M A, Hernandez M, Roca J, Almiñana C, Xiomara L, Cuello C, Vazquez J M, Martinez E A. (2010). Pentoxifylline added to freezing or post-thaw extenders does not improve the survival or in vitro fertilising capacity of boar spermatozoa. *Reproduction*, 139: 557-564.

Gradil C M, Ball B A. (2000). The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 1041-1047.

Guasti P N, Monteiro G A, Mazeiro R R, Martin I, Avanzi B R, Dellaqua J A, Papa F O. (2013). Effects of pentoxifylline on equine epididimal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33: 1153-1156.

Hassanpour H, Mirshokraei, Tajik P, Haghparast A. (2010). In vitro effects of pentoxifylline on kinematic parameters, capacitation, and acrosome reaction of ram epididymal sperm. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 377-381.

Hess K C, Jones B H, Marquez B, Chen Y, Ord T S, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zipping J H, Kopf G S, Suarez S S. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell*, 9: 249-259.

Hoskins D D, Stephens D T, Hall M L. (1974). Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 37: 131-133.

Inaba K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspective of protein components. *Molecular Human Reproduction*, 17: 524-538.

Inskeep P B, Hammerstedt R H. (1982). Changes in metabolism of ram sperm associates with epididymal transit or induced by exogenous carnitine. *Biology of Reproduction*, 27: 735-734.

Jaakkola U M. (1983) Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo. *Journals of Reproduction & Fertility*, 68: 465-470.

Jayaprakash D, Santhosh Kumar K, Shivaji S, Seshagiri P B. Pentoxifylline induces hyperactivation and acrosome reaction in spermatozoa of golden hamsters: changes in motility kinematics. *Human Reproduction*, 12: 2192-2199.

Jones R, James P S, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D. (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 9: 438-444.

Joseph A, Shur B D, Hess R A. (2011). Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biology of Reproduction* 84: 207-217.

Kinutani M. (1999). Effects of pentoxifylline on sperm motion characteristics in normozoospermic men defined by a computer-aided sperm analysis. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 48: 117-121.

Krapf D, Chun Ruan Y, Wertheimer EV, Battistone MA, Pawlak JB, Sanjay A, Pilder SH, Cuasnicu P, Breton S, Visconti PE. (2012). cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Developmental Biology*, 369: 43–53.

Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hastbacka J, Holmberg C, Kere J, Hoglund P. (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction*, 133: 775-784.

Leclerc P, Lamirande E, Gagnon C. (1996). Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*, 55, 648- 692.

Lewis S E M, Moohan J M, Thompson W. (1993). Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertility and Sterility*, 59: 418-423.

Mahony M C, Gwathmey T. (1999). Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 60: 1239- 1243.

McKinney K A, Lewis S E M, Thompson W. (1994). Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility, after drug removal, in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia*, 26: 235-240.

Moein M R, Khalili M A, Davoudi A. (2005). The effect of oral administration of pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicoceles. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3: 25-29.

Moore H D M. (1998). Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia*, 30: 233-239.

Okamaru N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 9699-9705.

Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19: 426:436.

Pang S C, Chan P J, Lu A. (1993). Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertility and Sterility*, 60: 336-343.

Pariset C C, Feinberg J M, Dacheux J L, Weinman S J. (1985). Changes in calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 74: 105-112.

Phillips D M. (1972). Comparative analysis of mammalian sperm motility. *The Journal of Cell Biology*, 53: 561-573.

Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, Futai M, Breton S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 74: 185- 194.

Queiroz G C D, Oliveira V V G, Gueiros O G, Torres S M, Maia F C L, Tenorio B M, Morais R N, Silva Junior V A. (2013) Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Animal Reproduction*, 10: 45:54.

Rashidi I, Movahedin M, Tiraihi T. (2004) The effects of pentoxifylline on mouse epididymal sperm parameters, fertilization and cleavage rates after short time preservation. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2: 51-57.

Robaire B, Hinton B T, Orgebin-Crist M C (2006). The epididymis. En: Neill J D, Challis J R G, Krester D M, Pfaff D W, Richards J S, Plant T M, Wassarman P M, (eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, vol. 1, 3rd ed. Elsevier. U.S.A. pp 1071–1148.

Safarinejad M R. (2011). Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *International Urology and Nephrology*, 43: 315-328.

Scott J D, Dell' Acqua M L, Fraser I D, Tavalin S J, Lester L B. (2000). Coordination of cAMP signaling events through PKA anchoring. *Advances in pharmacology*, 47: 175-207.

Seiler P, Cooper T G, Yeung C H, Nieschlag E. (1999). Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. *Journal of Andrology*, 20: 738-746.

Shadan S, James P S, Howes E A, Jones R. (2004). Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71: 253-265.

Shen M, Chiang P, Yang R, Hong C, Chen S. (1991). Pentoxifylline stimulates sperm motility both *in vitro* and after oral therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 31: 711-714.

Si Y. (1999). Hyperactivation of hamster sperm motility by temperature dependent tyrosine phosphorylation of an 80.kDa protein. *Biology of Reproduction*, 61: 247-252.

Si Y, Okuno M. (1999) Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of Reproduction*, 61: 240-246.

Si Y, Olds-Clarke P. (2000). Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation, *Biology of Reproduction*, 62: 1231-1239.

Sikka S C, Hellstrom W J G. (1991). The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *Journal of Andrology*, 12: 165-170.

Stachecki J J, Ginsburg K A, Armant D R. (1994). Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. *Journal of Andrology*, 15: 157-164.

Stanic P, Sonicki Z, Suchanek E. (2002). Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 25: 186-190.

Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. (1998). Effect of Pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15: 90-92.

Tash J S. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 14: 332-339.

Tash J S, Bracho G E. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *Journal of Andrology*, 15: 505- 509

Tash J S, Bracho G E. (1998). Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251: 557-563.

Tash J S, Means A R. (1983). Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biology of Reproduction*, 28: 75-104.

Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. (1992). Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Human Reproduction*, 7: 1257-1263.

Tournaye H, Janssens R, Devroey P, Steirteghem A V. (1994). The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospermic semen samples. *International Journal of Andrology*, 17: 113-120.

Travis A J, Merdiushev T, Vargas LA, Jones B H, Purdon M A, Nipper R W, Galatioto J, Moss S B, Hunnicutt G R, Kopf G S. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Developmental Biology*, 240: 599-610.

Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach J L, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R. (2000). Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17: 194-199.

Turner R M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, 18: 25-38.

Veri JP, Hermo L, Robaire B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione s-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *Journal of Andrology*, 14: 23-44.

Wade M A, Jones R C, Murdoch R N, Aitken R J. (2003). Motility activation and second messenger signaling in spermatozoa from rat cauda epididymis. *Reproduction*, 125: 175-183.

Wandernoth P M, Raubuch M, Mannowetz N, Becker H M, Deitmer J W, Sly W S, Wennemuth G. (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One*, 5: e15061.

Ward A, Clissold S P. (1983). Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficiency. *Drugs*, 34: 50-60.

Xie F, Garcia M A, Carlson A E, Schuh S M, Babcock D F, Jaiswal B S, Gossen J A, Esposito G, Van Duin M, Conti M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, 296: 253-262.

Yovich J M, Edirisinghe W R, Cummins J M, Yovich JL. (1990). Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 53: 715-722.

Zamboni L, Stefanini M. (1971). The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *The Anatomical Record*, 169: 155-172.

Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, Zheng M, Leung KL, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY, Ho LS, Chung YW, Chan HC. (2004). An epididymis-specific β -defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nature cell biology*, 6: 458-464.

Anexo A.

Fórmula de solución mR1ECM

Reactivo	Molaridad	gr/Lit
NaCl	110 mM	6.4
KCl	3.2 mM	0.23
CaCl	2.0 mM	0.221
MgCl 6H ₂ O	0.5 mM	0.101
NaHCO ₃	25 mM	2.1
Piruvato de Sodio	0.5 mM	0.05
Glucosa	7.5 mM	1.48

El pH de la solución es ajustado a 7.4 y es colocado en refrigeración hasta su uso.

Fórmula de solución de conteo de espermatozoides.

Reactivo	Cantidad
NaHCO ₃	5 gr
Azul de Tripán	0.025 gr
Formaldehido (36-40%)	1 ml

Los reactivos son diluidos en agua destilada y filtrado en papel Whatman (No. 1).