



**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Monterrey

**Efecto de la luz verde sobre espermatozoides de ratón.**

Tesis que presenta:

**Maricarmen Ríos Ramírez**

Para obtener el grado de:

**Doctora en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas.**

Director de tesis:

**Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez**



# Resumen

El efecto de la luz visible en sistemas biológicos ha sido estudiado por varios años. Los resultados de estos estudios muestran diversos efectos producidos por la radiación de luz visible, sin embargo, los mecanismos de interacción aún no parecen estar claros. Recientemente ha tomado fuerza el uso de radiación de luz visible para mejorar los parámetros de motilidad en espermatozoides, encontrando diversos efectos, tanto positivos como negativos. En la presente tesis se reporta el estudio experimental del efecto de la luz verde (490-540 nm) en la prevalencia de la motilidad de espermatozoide de ratón a 37°C y a 10°C, empleando una técnica óptica que se basa en el cálculo de la autocorrelación temporal. A estas dos temperaturas la prevalencia de la motilidad es muy diferente; a 10°C la motilidad se extiende hasta 24 horas, mientras que a 37°C a poco más de 1 hora en condiciones *in vitro*. Así mismo, también se realizaron experimentos de fluorescencia para determinar si existe un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides provocados por la exposición a luz verde en las mismas condiciones de los experimentos de motilidad. Por último, se estudió por medio de AFM si se producía un cambio en las propiedades elásticas de los espermatozoides al ser expuestos a luz verde. Nuestros resultados confirman que la luz verde puede interactuar con la materia biológica y que un efecto de esta interacción es el incremento de especies reactivas de oxígeno. No encontramos evidencia que las propiedades elásticas del espermatozoide fueran afectadas por la radiación de luz verde.



# Abstract

The effects of visible light on biological systems have been studied for several years, from mammal spermatozoa motility to protein structural changes. Data have shown that these systems interact in certain ways with light but the origin and mechanisms are still far from being understood. Thus more work on the subject is needed. In the present work we study the effects of green light (490-540 nm) on the motility of mouse spermatozoa with an optical technique of time-resolved correlation adapted to study several samples simultaneously. Image correlation analysis is used to follow the temporal behavior of the sperm samples at 10 °C and 37 °C. At these contrasting temperatures, the motility is radically different: at the lower one the prevalence is the lengthiest, according to a previous finding by our group. Our present results show that while green light extends the prevalence of sperm motility at 37 °C, it reduces it at 10 °C. This evidence suggests that green light is playing an important role in the spermatozoa motility. Also, we carried out experiments to determine if there was an increment in reactive oxygen species (ROS) in sperm irradiated with green light under the same conditions of motility experiments. Atomic Force Microscopy measurements were made to detect possible changes in the mechanical properties (adhesion forces) of the spermatozoa under the effect of green light. Our results of the motility experiments showed that green light influences mouse spermatozoa motility and ROS production or depletion mechanisms. We didn't find changes on the spermatozoa elastic properties by green light radiation.



# Índice general

<b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 LA LUZ VISIBLE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	1
1.2 EFECTO DE LA LUZ VISIBLE EN ESPERMATOZOIDES. ....	6
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL. ....	17
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES. ....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. ....	18
3.2 IRRADIACIÓN DE LA MUESTRA.....	18
3.2 MEDICIÓN DE MOTILIDAD. ....	19
3.3 MEDICIÓN DEL INCREMENTO DE ROS. ....	24
3.4 MEDICIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÁSTICAS DEL ESPERMATOZOIDE POR MEDIO DE AFM. ....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 EFECTO DE LA LUZ VERDE EN LA MOTILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS. ....	30
4.2 EFECTO DE LA LUZ VERDE EN LA PRODUCCIÓN DE ROS.....	34
4.3 EFECTO DE LA LUZ VERDE EN LAS PROPIEDADES ELÁSTICAS DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN. ....	37
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>61</b>
PUBLICACIONES Y COLABORACIONES .....	61

# Índice de figuras

## Introducción

Figura 1. 1 Espectro electromagnético.....	1
Figura 1. 2 Comparación de los efectos letales de la luz en <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	2
Figura 1. 3 Perfiles calorimétricos de la (a) $\beta$ L-cristalina y (b) ovoalbúmina.....	4
Figura 1. 4. Esquema comparativo de la morfología de un espermatozoide. ....	6
Figura 1. 5 Efecto de la luz en la motilidad de espermatozoide. ....	10
Figura 1. 6 Porcentajes de viabilidad y motilidad total de espermatozoide de jabalí.....	11

## Materiales y Métodos

Figura 3. 1 Montaje experimental.....	20
Figura 3. 2 Ejemplo de una secuencia de imágenes de un patrón de dispersión simple. ....	21
Figura 3. 3 Curvas de autocorrelación.....	22
Figura 3. 4 Experimento control a 10°C.....	23
Figura 3. 5 Parámetro de la prevalencia de la motilidad.....	24
Figura 3. 6 Ciclo representativo de una curva de fuerza.....	27
Figura 3. 7. Metodología para la toma de las curvas de fuerza en el espermatozoide de ratón.....	28

## Resultados

Figura 4. 1 Autocorrelación temporal y valores de $\tau$ de un experimento a 10°C. ....	31
Figura 4. 2 Parámetro de motilidad $\Theta$ . ....	32
Figura 4. 3 Prevalencia de la motilidad en espermatozoides de ratón expuestos a luz verde a 10°C (a) y 37°C (b). ....	33
Figura 4. 4 Imagen de fluorescencia obtenida en el confocal. ....	34
Figura 4. 5. Resultados de intensidad de fluorescencia a 37°C y 10°C.....	35
Figura 4. 6 Resultados de la intensidad de fluorescencia a diferentes temperaturas. ....	36
Figura 4. 7. Experimentos con AFM, evolución temporal. ....	38
Figura 4. 8. Resultados de las fuerzas de adhesión.....	39





# Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ATP	Trifosfato de adenosina
$Ca^{2+}$	Calcio
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
CASA	Analizador de espermatozoides automático
Fe-S	Sulfuro de hierro
$H^+$	Catión hidrógeno
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogeno
HAM	Motilidad hiperactivada
$K^+$	Potasio
$KCl$	Cloruro de potasio
LED's	Diodos emisores de luz
$MgSO_4$	Sulfato de Magnesio
$Na^+$	Sodio
$NaCl$	Cloruro de sodio
$NaN_3$	Azida de Sodio
$NaOH$	Hidróxido de sodio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PEI	Solución de polietilenimina
PKA	Proteína quinasa A
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno

SOD	Superóxido dismutasa
$O_2^{\bullet-}$	Anión superóxido
$\bullet OH$	Grupo hidroxilo

# Introducción

## 1.1 La luz visible en sistemas biológicos.

Hasta hace años se esperaba que sólo las plantas y bacterias fotosintéticas tuvieran moléculas capaces de transformar la luz en energía química, aunque ya se sabía que las células animales tenían cromóforos. El efecto producido por la radiación de luz visible en sistemas biológicos ha llamado la atención de diferentes grupos de investigación debido a su respuesta, tanto dañina como terapéutica dependiendo del sistema biológico. La importancia de estudiar estos efectos nace de la realidad actual, donde los humanos pasamos gran parte de nuestra vida expuestos a este tipo de radiación, así como en tratamientos médicos donde se usa la fotomodulación. La luz visible es un tipo de radiación electromagnética no ionizante con longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm (Figura 1.1).

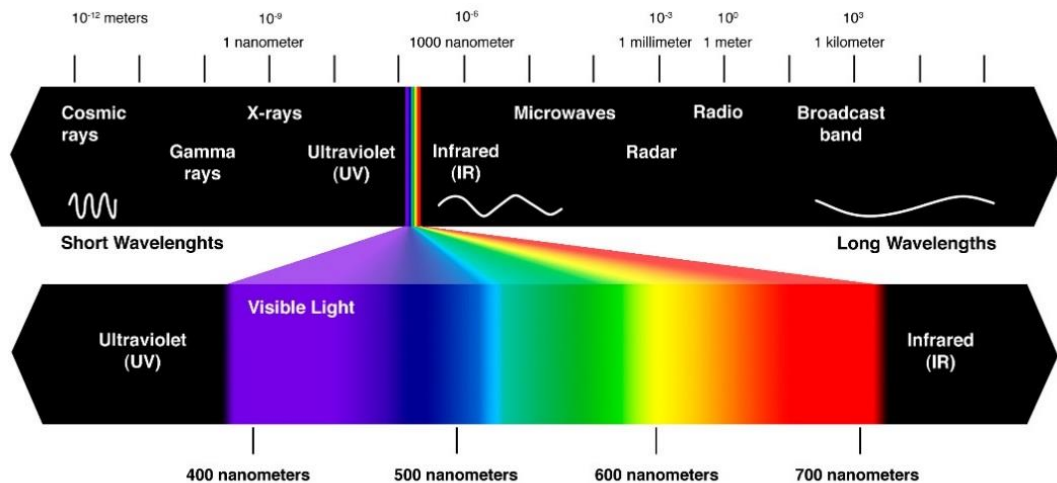


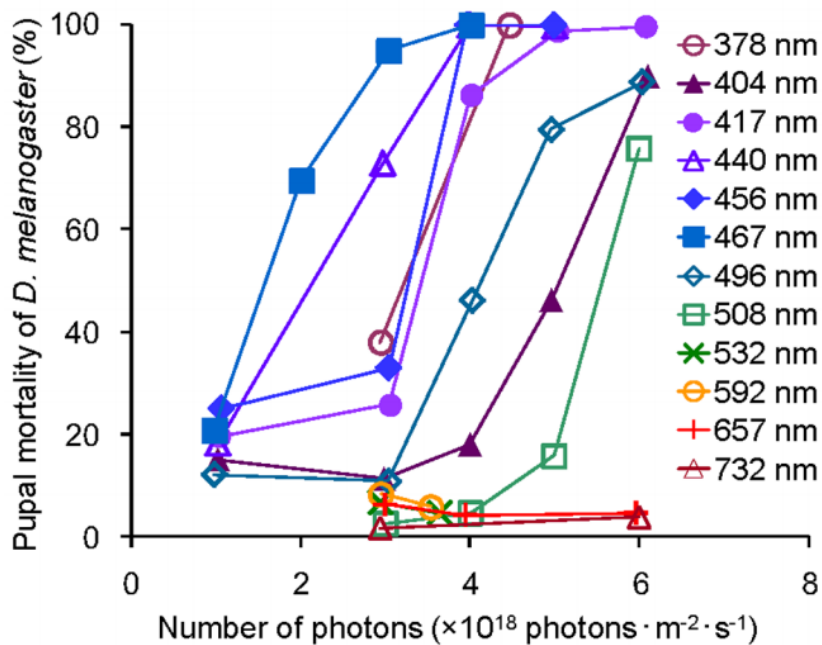
Figura 1. 1 Espectro electromagnético.

Cada longitud de onda tiene asociada determinada energía según la ecuación de Planck:

$$E = h \frac{c}{\lambda}, \quad (1)$$

donde  $E$  es la energía de los fotones con longitud de onda  $\lambda$ ,  $c$  es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s) y  $h$  es la constante de Planck ( $6.63 \times 10^{-34}$  J·s). Así, los fotones con una longitud de onda pequeña tienen mayor energía.

Recientemente Y. Kuse et al. [1] reportaron un severo daño causado por luz azul emitida por diodos emisores de luz (LED's) en células fotorreceptoras provenientes de retina de ratón. Tal daño se lo atribuyen al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en las células. Hori et al. [2] publicaron un estudio donde realizaron una comparación de los efectos letales de la luz en huevecillos, larvas, pupas e insectos adultos de *Drosophila melanogaster* utilizando diferentes longitudes de onda, encontrando que la radiación emitida por luz azul era la más dañina (Figura 1.2).



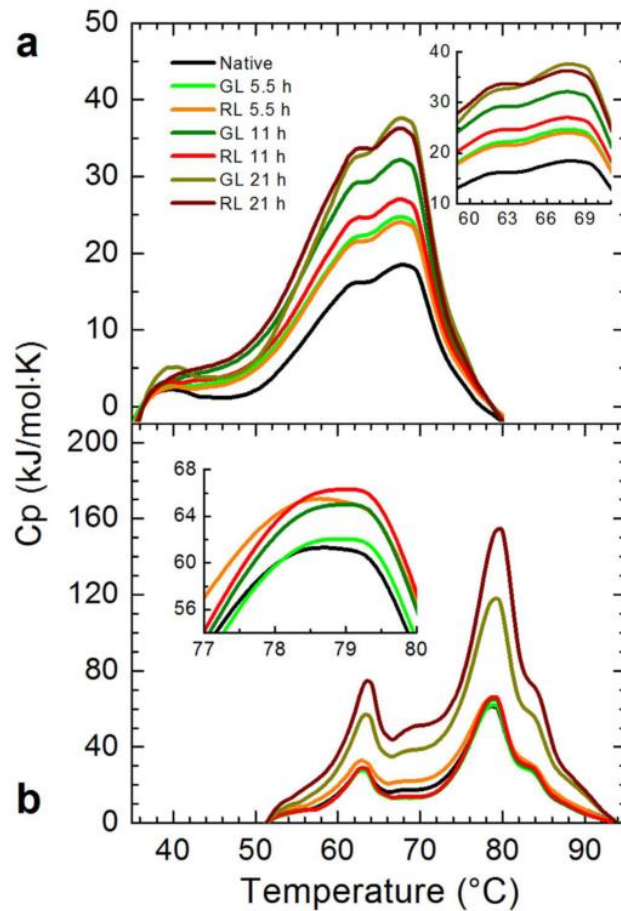
**Figura 1. 2 Comparación de los efectos letales de la luz en *Drosophila melanogaster*.** Curva dosis respuesta para el efecto letal en pupas de *Drosophila melanogaster* a diferentes longitudes de onda procedentes de LED's. Adaptado de [2].

Por otra parte, la luz roja de fuentes monocromáticas de baja intensidad puede estimular el desarrollo en plantas, afectar el nivel de expresión de enzimas relacionadas a estrés oxidativo de *Escherichia coli* (E. coli) en agua de mar, modificar la síntesis de ADN en células de cáncer cervical (células HeLa), así como el crecimiento de otros tipos de bacterias y levaduras [3-5].

En el caso de la luz verde se ha encontrado que la exposición a ésta causa una reducción en la expansión radial de hongos, el crecimiento de las células HeLa, rompimientos en el ADN de células de la retina en ratas, cambios modulados en la actividad de la enzima colagenasa y un incremento en la actividad antioxidante de la cebada [7-10].

Un fenómeno muy particular e interesante se encontró al estudiar los efectos producidos por la luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo en dos proteínas globulares:  $\beta$ L-cristalina y ovoalbúmina. Los cambios fueron evaluados mediante la respuesta calorimétrica, la distribución del tamaño de partícula, la estructura secundaria y la emisión de fluorescencia. Se obtuvieron los perfiles calorimétricos de las proteínas  $\beta$ L-cristalina y ovoalbúmina que fueron expuestas a luz verde y roja por diferentes intervalos de tiempo (5.5, 11 y 21 horas), como puede verse en la Figura 1.3. En ensayos de calorimetría las temperaturas de transición (picos calorimétricos) de las proteínas nativas fueron similares a las reportadas en la literatura con diferentes buffers [11, 12], cuyos valores son  $67.87 \pm 0.48$  °C y  $78.66 \pm 0.02$  °C para  $\beta$ L-cristalina y ovoalbúmina, respectivamente. No obstante, es evidente que el área bajo la curva (entalpía) aumenta a medida que el tiempo de irradiación incrementa (de 305 a 732 kJ/mol para la  $\beta$ L-cristalina, y de 867 a 2,252 kJ/mol para la ovoalbúmina). Ambas longitudes de onda tienen un efecto calorimétrico en la  $\beta$ L-cristalina (Figura 1.3a), la cual es más pronunciada con la luz verde, especialmente en tiempos intermedios. Por otro lado, la luz roja causa un efecto importante en la ovoalbúmina (Figura 1.3b) con una respuesta significativa en el tiempo de exposición de 21 horas. (ver los insets de la Figura 1.3b). Estos resultados ilustran que ambos

tipos de luz inducen cambios en estas proteínas, con el consecuente aumento en la entalpía. Los resultados muestran que ambas longitudes de onda inducen cambios conformacionales como la agregación de la  $\beta$ L-cristalina y el aumento de la cohesión en ambas proteínas. Los autores del trabajo en [13] señalan que el origen de este efecto consiste en un aumento en general en el número de puentes de hidrógeno y probablemente en su intensidad.



**Figura 1. 3** Perfiles calorimétricos de la (a)  $\beta$ L-cristalina y (b) ovoalbúmina, expuestas a luz verde y roja.  $\beta$ L-cristalina (a) y ovoalbúmina (b) se expusieron a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo (5, 5, 11 y 21 h). Después de la exposición las muestras se almacenaron a 4 ° C durante 24 horas y se evaluó el efecto de dichas exposiciones mediante calorimetría. Las muestras nativas (líneas negras) mostraron temperaturas de transición principal a  $67.87 \pm 0.48$  ° C y  $78.66 \pm 0.02$  ° C para  $\beta$ L-cristalina (a) y ovoalbúmina (b), respectivamente. Se observó que ambos tipos de luz afectan las proteínas. En el primer caso, los cambios de entalpía son más notorios con la luz verde (GL líneas verdes); mientras que en el segundo caso la luz roja (RL líneas rojas) produce un cambio más prominente. Estos cambios aumentan a medida que aumenta el tiempo de exposición. Adaptado de [13].

Diversos grupos de investigación están interesados principalmente en el efecto terapéutico de la luz visible en sistemas biológicos. La radiación de luz visible de baja energía (luz roja y verde) incrementa la velocidad de curación de defectos óseos [14]; también hay evidencia que la radiación con luz visible promueve la restauración de nervios periféricos dañados [15]. De experimentos *in vitro* se sabe que la radiación con luz visible incrementa la proliferación celular [14-16], induce la respiración de neutrófilos [17] y mejora la capacidad de fertilización de células espermáticas [18]. En 1998 Cohen et al. irradiaron con un láser He-Neón de 630 nm espermatozoides de ratón y estudiaron su efecto en el flujo de  $Ca^{2+}$  [18]. Estos autores midieron la concentración interna de  $Ca^{2+}$  con Fluo-3 (Molecular Probes) antes y después de un minuto de irradiación. Observaron un incremento en el calcio intracelular estimulado por la exposición a luz. También evaluaron la participación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje añadiendo un inhibidor para éstos y encontraron su participación en el flujo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior de la célula debido a la irradiación de luz visible.

El mecanismo celular por el cual interactúa la luz visible con la materia biológica aún se encuentra en extenso estudio [17,19,20]. Aunque no se ha establecido el mecanismo específico, la mayoría de los grupos de investigación están de acuerdo en que la primera acción de la radiación con luz visible es la formación de especies reactivas de oxígeno por medio de fotosensibilizadores celulares endógenos [10, 19,21,22]. Estos fotosensibilizadores del rango de la luz visible pueden ser porfirinas [23-25], citocromos en la mitocondria [26], los cofactores de piridina, NADPH y NADH [27], clústers de Fe-S [28] y flavoproteínas/riboflavinas [29-32].

Recientemente se ha mostrado que una producción baja de ROS (en contraste con producción alta la cual destruye a la célula) actúan como mensajeros que activan procesos celulares como factores de transcripción, expresión de genes, contracción de músculos y crecimiento celular [33-36]. Por lo tanto, en las células espermáticas hay evidencia de que pequeñas cantidades de ROS están envueltas en la capacitación y reacción acrosomal, estos estudios han revelado la correlación entre la glucosa-6-



fosfato deshidrogenasa y la generación de ROS en espermatozoides de humano, los cuales sugieren que NADPH podría ser la fuente de electrones para la reducción inicial de oxígeno a anión superóxido en estas células [82]. Aitken et al. demostraron que NADPH puede actuar como un sustrato para la generación de ROS en espermatozoides de humano [37].

## 1.2 Efecto de la luz visible en espermatozoides.

El espermatozoide es una célula diferenciada formada por dos partes principales: la cabeza y el flagelo. La cabeza a su vez está integrada por el acrosoma, vesícula membranal que contienen enzimas líticas que permiten la penetración de la zona pelúcida que rodea al ovulo, y el núcleo, que contiene al ADN. El flagelo es la estructura que le confiere propiedades motiles para su desplazamiento y consta de tres regiones: la región media (axonema), la pieza principal y la pieza final (Figura 1.4).

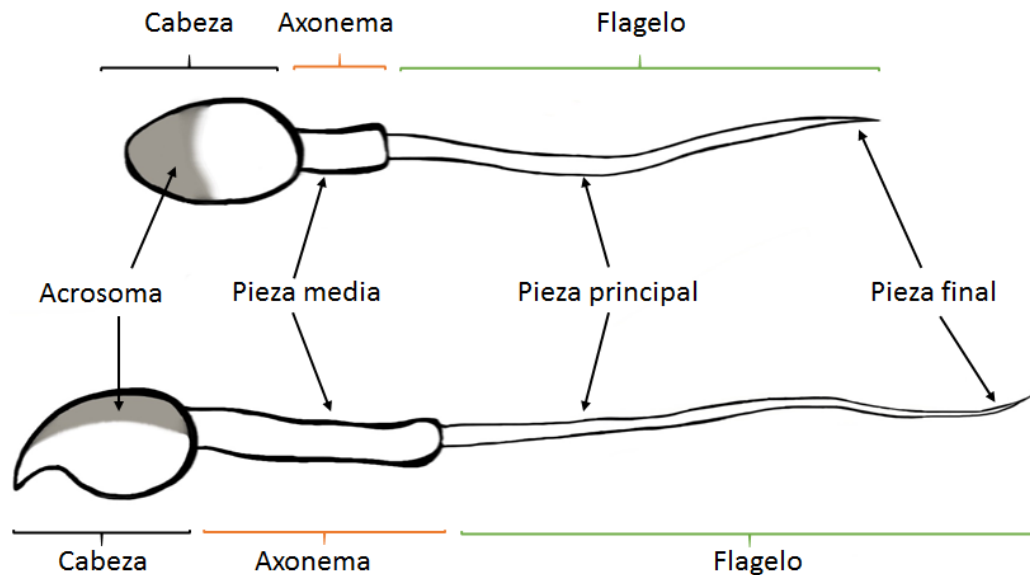


Figura 1. 4. Esquema comparativo de la morfología de un espermatozoide de humano y de ratón donde se señala las partes principales.

El axonema está compuesto por un par central de microtúbulos rodeados por 9 pares externos. Los microtúbulos están asociados a los brazos de dineína que son los responsables de generar la fuerza motora del flagelo. Rodeando a toda esta estructura se encuentran las fibras externas densas, la vaina mitocondrial y la membrana plasmática [92]. En los espermatozoides de mamífero las mitocondrias sólo se encuentran en la vaina mitocondrial y como en otras células, producen ATP a través de la respiración aeróbica. Las dineínas del axonema tienen un alto requerimiento de ATP como fuente de energía para el movimiento del flagelo. Si la única fuente de ATP son las mitocondrias, el ATP tendría que difundirse cierta distancia para suministrar adecuadamente toda la longitud del axonema. Se han desarrollado modelos matemáticos para determinar este proceso y sugieren que el ATP producido por las mitocondrias no es suficiente para cubrir las necesidades energéticas de los brazos de dineína [93]. Esto sugiere que la fosforilación oxidativa en la mitocondria no es la fuente principal de ATP para la motilidad.

La activación de la movilidad en los espermatozoides se da cuando salen de los tubos seminíferos desde los testículos durante su maduración en el epidídimo, donde permanecen listos para fecundar el óvulo. Cuando los espermatozoides tienen contacto con el tracto genital de la hembra, el espermatozoide de mamífero adquiere la motilidad hiperactivada (HAM por sus siglas en inglés) la cual se caracteriza por un movimiento vigoroso y asimétrico del flagelo [18].

La capacitación del espermatozoide es un proceso complejo que incluye cambios moleculares bioquímicos y fisiológicos que le confieren la capacidad de llegar hasta donde está el ovulo. La capacitación es necesaria para que se pueda dar la reacción acrosomal, la cual sucede cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida del óvulo. Los principales eventos durante la capacitación son: remoción de colesterol y reorganización de la membrana plasmática, aumento en la fosforilación de proteínas tirosinas, hiperpolarización de la membrana celular, alcalinización del pH intracelular, aumento de calcio intracelular y de nucleótidos cíclicos [83]. Una consecuencia de la capacitación es la motilidad hiperactivada.

Existen numerosos estudios donde se ha demostrado que la capacitación e hiperactivación del espermatozoide dependen de la presencia de diferentes iones en el medio extracelular, tales como  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $HCO_3^-$  (bicarbonato) [84] y que la capacitación in vitro requiere de tres componentes claves:  $Ca^{2+}$ ,  $NaHCO_3$  (bicarbonato de sodio) y albúmina de suero bovino (BSA) [85].

El movimiento del flagelo no solamente es regulado por la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se ha demostrado que, si este proceso es defectuoso en espermatozoides de ratón, la fertilización puede llegar a ocurrir, el espermatozoide sigue produciendo ATP y aún se observa motilidad de la célula [86].

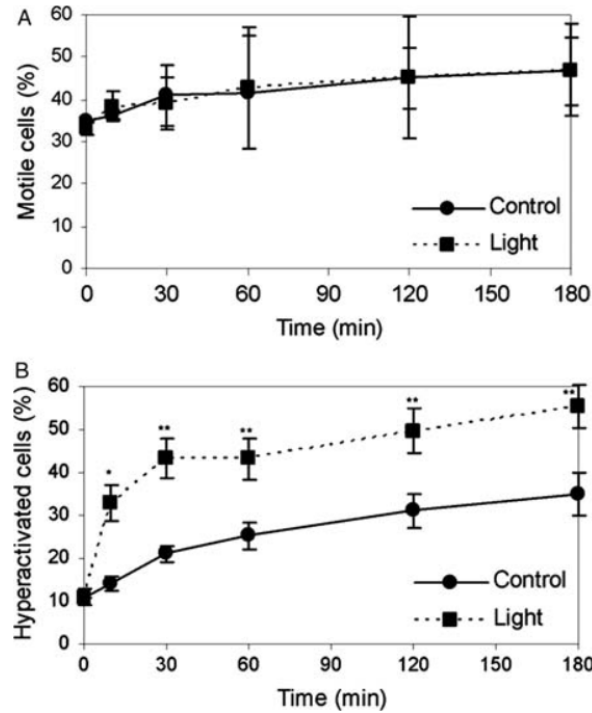
Las vías de señalización dependientes de cAMP/PKA y  $Ca^{2+}$  son generalmente reconocidas como las dos vías de señalización principales en la regulación de la motilidad en espermatozoides de mamífero [87, 88, 89 y 90]. Hay evidencia significativa que sugiere el paso de calcio extracelular a través de canales de membrana y esto regula en gran medida la motilidad [88 y 90].

El estudio de la motilidad del espermatozoide es vital para el entendimiento de la reproducción biológica, por esta razón es interesante saber cómo mejorar la motilidad del espermatozoide por efecto de la luz visible. Diversos trabajos se han enfocado en estudiar la motilidad hiperactivada con el objetivo de mejorar las habilidades de nado de los espermatozoides. La exposición a luz visible ha sido usada con este objetivo desde hace varios años [18,41]. Se ha reportado que espermatozoides de ratón y conejo irradiados con luz roja que proviene de un láser He-Ne, incrementan la capacidad de fertilizar el ovulo [18,41,42]. El origen de este efecto aún se encuentra en especulación, sin embargo, hay evidencia se piensa que es regulado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y esto mismo afecta la concentración de  $Ca^{2+}$  en la célula. Los espermatozoides producen espontáneamente una variedad de (ROS), incluyendo el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y óxido nítrico (NO) [43]. Cuando se producen en

pequeñas cantidades, las ROS son importantes para que se den las cascadas de fosforilación de tirosina, las cuales están asociadas en la capacitación del espermatozoide. Sin embargo, cuando la producción de ROS excede las limitaciones de la respuesta de defensa antioxidante del espermatozoide, se induce un estado de estrés oxidativo.

Zan-Bar et al. midieron el efecto de diferentes longitudes de onda de luz visible en espermatozoide de peces y carnero [44], observando cambios de concentración en  $Ca^{2+}$  intracelular y diferencias significativas en la producción de ROS atribuidas a fotosensibilizadores específicos. Igualmente, en su estudio remarcan que pequeñas cantidades de ROS participan en procesos de transducción de señales importantes.

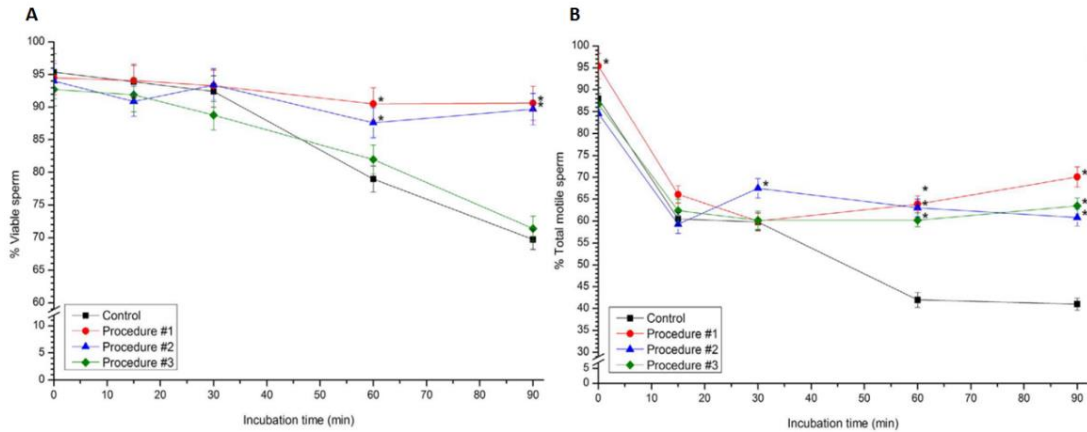
Recientemente, Shahar et al. encontraron que el espermatozoide de humano expuesto a luz visible con una energía máxima correspondiente a 600 nm, mostraba un incremento en HAM y ROS. En la Figura 1.5 B se muestran los resultados de este estudio donde se irradió con luz visible (400-800nm) por 3 minutos a  $40 \text{ mW/cm}^2$  espermatozoide de humano incubado en un medio de capacitación. Los resultados muestran un aumento en HAM mayor al 100%. Sin embargo, este efecto no se refleja en un aumento de la motilidad total, (ver figura 1.5 A) [45]. Los autores evaluaron las posibles vías de señalización que podrían participar en esta respuesta. Afirman, respaldados en sus experimentos, que el incremento de  $Ca^{2+}$ , la producción de ROS en la mitocondria y la proteína cinasa A (PKA y la familia de proteínas del sarcómero) son reguladas por el efecto de la luz. Posteriormente, este mismo grupo de investigación repitió los experimentos con espermatozoides de ratón encontrando resultados similares a su estudio previo [46]. Ellos proponen una vía de señalización donde el incremento de HAM es ahora atribuido a una activación dependiente de ROS del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Por otro lado, Lubart et al. sugiere que la luz visible induce la producción de ROS y mejora la capacitación es por una vía que incluye la NADPH oxidasa [47].



**Figura 1. 5 Efecto de la luz en la motilidad de espermatozoide.** Espermatozoides de 30 donadores fueron irradiados con luz visible por 3 min. La motilidad fue medida a diferentes tiempos durante la capacitación usando CASA: (A) Efecto de la luz en la motilidad total durante la capacitación: (B) Efecto de la luz en HAM durante la capacitación. Adaptado de [45].

Recientemente, Yeste et al. evaluaron el efecto de la luz roja en diferentes parámetros de la motilidad de espermatozoide de jabalí [48]. La motivación de tal estudio fue mejorar las condiciones de inseminación artificial para reproducción de la especie. La fotoestimulación se llevó a cabo a la temperatura de 16°C y la medición de los parámetros se realizó durante una incubación de 37°C. En su artículo los autores evaluaron el efecto de irradiar con luz roja emitida por un arreglo de LEDs usando 3 diferentes patrones de fotoestimulación: (i) 10 minutos de exposición a la luz, seguido de 10 minutos de total oscuridad y de nuevo 10 minutos de luz; (ii) 15 minutos de exposición a la luz, seguido de 10 minutos de oscuridad y de nuevo 15 minutos de luz; (iii) 20 minutos de exposición a la luz, seguido de 10 minutos de oscuridad y de nuevo 20 minutos de luz. De todos los patrones que utilizaron, el mejor fue 10 min. de luz, 10 min. de oscuridad y 10 min. de luz. Este patrón mostró un intenso incremento en la mayoría de los patrones de motilidad, sin modificar la viabilidad del espermatozoide y la integridad del acrosoma (Figura 1.6). Cuando se incuban los espermatozoides a 37°C por 90

min. sin luz decrecen todos los parámetros de la motilidad, lo cual puede ser prevenido cuando a la muestra previamente se le aplica el procedimiento descrito anteriormente con una incubación de 16°C.



**Figura 1. 6 Porcentajes de viabilidad y motilidad total de espermatozoides de jabalí.** Los espermatozoides fueron incubados a 37°C por 90 min después de ser irradiados con luz visible: A) Porcentaje de viabilidad; B) porcentaje de motilidad total. Los resultados mostrados son el promedio de 12 experimentos separados. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con el valor de su respectivo control en el mismo instante de tiempo. Adaptado de [48].

Los resultados también mostraron un evidente incremento en los parámetros de motilidad y una mejora en la capacitación *in vitro*. Los autores no proponen ningún mecanismo claro por el cual la luz roja estimula los espermatozoides. También sugieren que la diferencia de intensidad y tiempo de exposición puede modificar de manera diferente la actividad de la mitocondria por medio de la interacción de la luz con los elementos de la cadena de electrones en ésta, tales como los complejos de los citocromos. La longitud de onda utilizada en este trabajo es capaz de activar el complejo citocromo c/citocromo c oxidasa.

Más recientemente, Preece et al. analizaron el posible daño al ADN de espermatozoides de humano expuestos a luz roja emitida por un láser [49]. Ellos introducen un método alternativo para medir la motilidad de espermatozoide bajo la influencia de luz roja, el cual es basado en un algoritmo de seguimiento de onda. Los autores observaron un aumento en la velocidad de nado de los espermatozoides y

tanto el daño oxidativo como los niveles de roturas de doble cadena en el ADN fueron insignificantes.

La luz verde (532 nm) también se ha utilizado para aumentar los parámetros de calidad del semen del búfalo [50]. Una vez más el efecto de la luz fue mejorar los parámetros de motilidad del espermatozoide como la velocidad, distancia y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. Debido a que las mitocondrias son el organelo con mayor concentración de cromóforos que absorben más eficazmente en longitudes de onda más cortas, existen algunos estudios en los cuales se correlacionan la motilidad con la actividad mitocondrial, esto en espermatozoides de humano [38]. Sin embargo, se sabe que, en algunas especies como el jabalí, la glicolisis es la responsable de la síntesis de más del 95% de ATP, mientras que el ciclo de Krebs sintetiza menos del 1% total de ATP [39].

Otro estudio en espermatozoides de humano fue hecho por Sato et al., en donde se irradiaron con un láser de Kriptón ( $\lambda = 647\text{nm}$ ) a diferentes intensidades ( $4\text{ Jcm}^{-2}$ ,  $8\text{ Jcm}^{-2}$  y  $32\text{ Jcm}^{-2}$ ) los espermatozoides y se encontró que el porcentaje de motilidad total incrementa, especialmente cuando la intensidad fue de  $32\text{ Jcm}^{-2}$ , lo que representa un aumento de 8-10% [69]. Estos autores no reportaron un efecto en la velocidad, lo que sugiere que la radiación con láser induce a las células no-motiles a moverse, en lugar de aumentar sus parámetros cinemáticos. Como podemos darnos cuenta, este resultado entra en contradicción con resultados anteriormente discutidos [45]. Esto nos dice que el efecto de la luz visible depende mucho de las condiciones del experimento, la fuente de luz usada, la longitud de onda y la especie en estudio.

En la Tabla 1, se muestra un resumen de algunos trabajos encontrados en la literatura donde podemos apreciar las diferencias antes mencionadas.

**Tabla 1. Resumen de los principales efectos de la estimulación con luz visible en espermatozoides de ratón.**

Especie	Fuente de luz	Longitud de onda	Efectos	Referencia
Bovino	Láser (He-Ne y Diodo)	632 nm(He-Ne) 780 nm(Diodo)	Incremento del transporte de $Ca^{2+}$ .	Lubart et al. (1992)
Bovino	Lampara	400-800 nm	Incremento en la producción de ROS en la mitocondria.	Lavi et al. (2010)
Búfalo	Láser (Diodo)	532 nm	Incremento en los parámetros de motilidad.	Abdel-Salam et al. (2011)
Perro	Láser (Diodo)	655 nm	Incremento en los parámetros de motilidad.	Corral-Baqués et al. (2009)
Humano	Láser (Krypton)	647 nm	Incremento de la motilidad total y en ROS	Sato et al. (1984)
Humano	LED	470-850 nm	Incremento de la rapidez en los espermatozoides. Baja de espermatozoides no-motiles.	Ban Fragez et al. (2015)
Humano	Láser (Diodo)	633 nm	Incremento de VCL. No hubo daño al ADN.	(Preece et al. (2017)
Ratón	Láser (He-Ne y Diodo)	630 nm(He-Ne) 780 nm(Diodo)	Incremento de la habilidad de fertilizar después de la exposición a 630 nm.	Cohen et al. (1998).
Carnero	Láser (He-Ne)	632.8	Incremento en la motilidad, contenido de ATP y actividad de COX.	(Iaffidano et al. (2016)
Jabalí	LED	620-630 nm	Incremento en los parámetros de motilidad.	M. Yeste et al. (2016)

Existen diversos estudios sobre las características morfológicas de espermatozoides por medio de AFM, técnica que provee información de la topología tridimensional del espermatozoide, así como de sus propiedades mecánicas [80,81]. Dreyer et al. estudiaron el cambio en las características morfológicas de espermatozoides de bovino irradiados con un láser de He-Ne (633nm) mediante la técnica de microscopia de fuerza atómica (AFM). Encontraron un cambio de volumen en la región acrosomal de la cabeza de espermatozoide que puede deberse a que la exposición de luz induce reacción acrosomal en los espermatozoides [51].

En general, la mayoría de los estudios se llevan a cabo a 37°C y se sugieren diferentes vías de señalización como posibles participantes en el incremento de la motilidad después de irradiar con luz visible. Huang et al. proponen que los fotones son absorbidos por cromóforos en la mitocondria provocando un aumento de la fosforilación oxidativa, producción de ATP, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) [91]. Así mismo Shahar et al. proponen que la



generación de ROS en la mitocondria debido a la exposición de luz activa canales de Ca dependientes de voltaje, esto desencadena un aumento de Ca intracelular el cual activa a la enzima adenil ciclasa soluble (sAC) que, a su vez aumenta los niveles de adenil monofosfato cíclico (cAMP) que activa la proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA fosforila la proteína oncogénica tirosina quinasa (SRC), SRC fosforila al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y gelsolina. Estas dos últimas están involucradas en la polimerización de actina que se sabe que induce la hiperactivación en los espermatozoides [45]. En esta tesis, exploramos los efectos de la luz verde en la motilidad del espermatozoide de ratón no sólo a 37°C, la temperatura generalmente usada, sino también a 10°C. La razón por la cual escogimos una temperatura más baja que la fisiológica debido a que anteriormente se encontró que la motilidad a 10°C prevalecía por mucho más tiempo que a 37°C [52]. Si la motilidad a 10°C prevalece por más tiempo debido a un menor metabolismo. Hipótesis a la que se podría recurrir para explicar tal extensión, era interesante determinar el efecto de la luz verde en dicho fenómeno.

Usualmente, los parámetros de motilidad son medidos mediante un programa de análisis de espermatozoides asistido por ordenador (CASA). Este software requiere un alto poder computacional, además de sofisticados algoritmos. La mayoría de las veces el costo de este análisis es muy elevado. La información obtenida del análisis con CASA proviene de pequeñas muestras de espermatozoides. En este trabajo empleamos un método diferente reportado por nuestro grupo de investigación. Nuestro principal interés es evaluar la prevalencia de la motilidad en la población total, así que por esta razón no es necesario tener una visualización de las células a nivel individual. Esto nos permite llevar a cabo un estudio con temperatura controlada y radiación *in situ*. Finalmente, dado que nuestra muestra es seleccionada por el método de “*swim up*” (ver metodología), la mayor parte está compuesta por células con motilidad progresiva; lo cual fue confirmado varias veces en un microscopio y está respaldado por diversos trabajos en la literatura [53, 54]. Debido a que en la mayoría de los estudios citados anteriormente se menciona que uno de los elementos claves del

efecto de la luz visible es la producción de ROS, en este trabajo evaluamos su incremento producido por la exposición a la luz verde en el espermatozoide de ratón a 37°C y 10°C. A su vez, con el afán de buscar otra posible explicación y tomando en cuenta los efectos anteriormente discutidos en proteínas individuales, se decidió hacer un estudio de las propiedades elásticas de los espermatozoides irradiados con luz verde. Esto con el fin de determinar una posible correlación entre el efecto reportado en las proteínas y el cambio de elasticidad de la membrana del espermatozoide.

# Hipótesis

La irradiación con luz verde en espermatozoides de ratón afecta la prevalencia de la motilidad debido a un incremento de las especies reactivas de oxígeno.

# Objetivos

## 2.1 Objetivo general.

Estudiar el efecto de la luz verde en el espermatozoide de ratón.

## 2.2 Objetivos particulares.

- Estudiar el efecto de la luz verde en la prevalencia de la motilidad en espermatozoide de ratón a diferentes temperaturas.
- Estudiar el efecto de la luz verde en la producción de especies reactivas de oxígeno en espermatozoide de ratón a diferentes temperaturas.
- Estudiar el efecto de la luz verde en las propiedades elásticas del espermatozoide de ratón.

# Materiales y Métodos

## 3.1 Preparación de la muestra.

Los espermatozoides son extraídos del epidídimo de ratones macho de la cepa CD1 de 3-5 meses de edad. El epidídimo es disectado y depositado en 2mL de solución Whitten-Hepes (WH): 135 mM de  $NaCl$ , 5 mM de  $KCl$ , 2 mM de  $CaCl_2$ , 1mM de  $MgSO_4$ , 10mM de HEPES, 10mM de glucosa y 1mM de piruvato de sodio, a pH 7.3 ( $NaOH$ ). El medio WH mantiene las condiciones fisiológicas para la incubación de espermatozoides de mamífero. Posteriormente se realizan 6 incisiones en el epidídimo dentro de la misma solución para usar el método “swim-up”, que permite separar los espermatozoides con motilidad progresiva. Con este método se obtiene una muestra con más del 80 % de espermatozoides motiles. Finalmente, la parte superior de la solución que contiene los espermatozoides de mayor motilidad es aislada en otro contenedor con el fin de evitar la contaminación de tejidos del epidídimo. Para evitar la contaminación bacteriana se usó penicilina al 1% en cada muestra, no sin antes haber realizado pruebas con diferentes antibióticos a diferentes concentraciones para determinar cuál y que concentración no afectaba la motilidad de los espermatozoides.

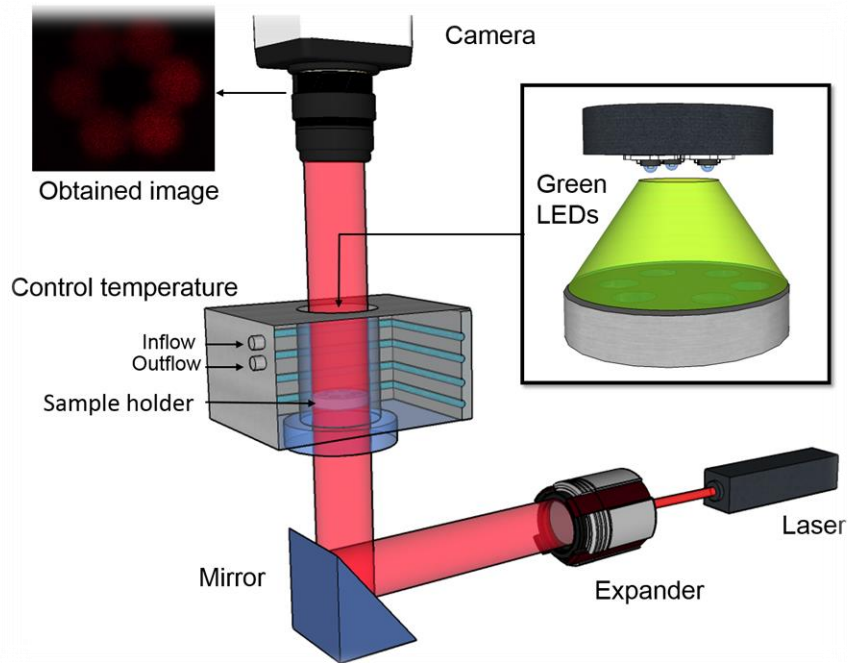
## 3.2 Irradiación de la muestra.

Las muestras con espermatozoides fueron expuestas a luz verde (490-540 nm) emitida por un arreglo de diodos emisores de luz (LED's) de alta potencia (LED-P1G70-120). El arreglo está compuesto por tres LED's de la misma longitud de onda, colocados sobre un soporte de aluminio circular y conectados en paralelo a una

fuentes de voltaje de corriente directa (E3632A, Agilent) de 3.6 Volts. El porta muestras es una cámara pequeña de acero inoxidable, la cual contiene seis pozos a ser cargados con la suspensión de espermatozoides, esto con el fin de irradiar y analizar seis muestras simultáneamente. El porta muestras se sella con dos tapas de acrílico para encapsular las muestras líquidas. Cada pozo es llenado con 200  $\mu\text{l}$  de suspensión con espermatozoides. El arreglo de LED's es colocado arriba del porta muestras a una distancia de 1.5 cm. La intensidad de luz emitida por el arreglo fue de  $1125 \times 10^2 \text{ lx}$ , la cual fue registrada mediante un luxómetro Lutros LX-1108. Esta intensidad de Luz corresponde a una dosis de  $33.44 \text{ J/cm}^2$  por hora registrada con un radiómetro digital (RM2-Dr. Gröbel). Este arreglo experimental se muestra en la Figura 3.1. Las muestras fueron irradiadas a las temperaturas de  $37^\circ\text{C}$  y  $10^\circ\text{C}$  hasta que se dejó de registrar motilidad.

### 3.2 Medición de motilidad.

Para el registro de motilidad de las muestras se proyecta un haz láser (gas Helio-Neón, 633nm, 1mW) sobre un espejo, con el fin de reflejar dicho haz hacia el fondo del porta muestras. La luz del láser que pasa por las seis muestras produce un patrón de dispersión resultante del movimiento de los espermatozoides, el cual fue grabado con una cámara digital (PixeLINK). El porta muestras es situado dentro de una cámara de aluminio con serpentines que permiten controlar la temperatura por medio de un sistema de recirculación de agua (Temperature controller, PolyScience) con una precisión de  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ . Así mismo la temperatura fue monitoreada con un termopar (NI USB-TC01). Todo lo anterior se muestra en la Figura 3.1 del arreglo experimental.



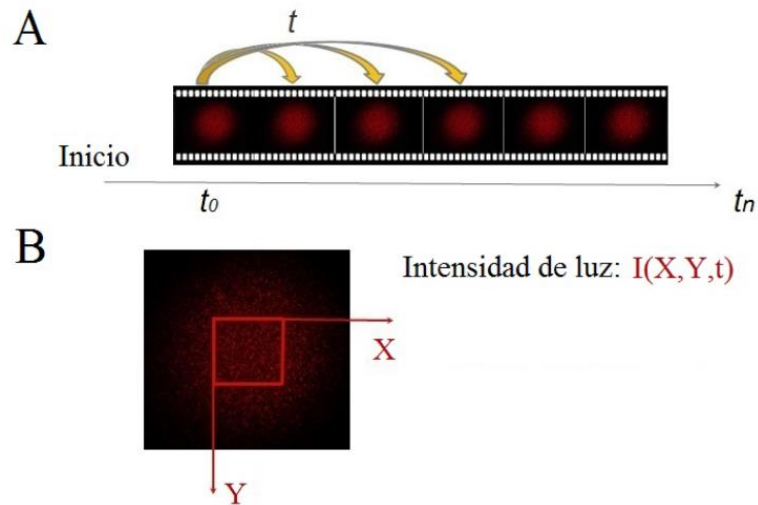
**Figura 3. 1 Montaje experimental.** Un haz láser es conducido hacia el interior de una cámara que contiene las muestras. El porta muestras tiene seis reservorios pequeños que permiten el paso de la luz a través de la muestra. El patrón de dispersión resultante es grabado con una cámara digital para un análisis posterior de correlación de imágenes.

El registro de la motilidad se llevó a cabo tomando 180 fotos de cada muestra cada 30 minutos (experimentos a 37°C) y 60 minutos (experimentos a 10°C), hasta que la motilidad de la muestra no se observara en los característicos patrones de dispersión.

La motilidad celular fue estimada usando un análisis de autocorrelación temporal de las imágenes. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con un programa semiautomatizado en el cual en cada medición el primer cuadro ( $t_0$ ) es comparado con el resto de ellos ( $t_n$ ) uno a uno, como se muestra en el ejemplo de la Figura 3.2 (A). Simultáneamente, se toma un recuadro de 100x100 píxeles como matriz de intensidad en función de la ubicación del plano X-Y y el tiempo, a la cual denotamos como  $I(X,Y,t)$ , y que se muestra en la Figura 3.2 (B) en escala de grises. Esto significa que se requiere el valor de intensidad de cada posición de la imagen (píxel). La función de autocorrelación de imágenes está definida como

$$c_I(t_0, t) = \frac{1}{\beta} \left[ \frac{\langle I(t_0, t) I(t_0+1) \rangle_{X,Y}}{\langle I(t_0, t) \rangle_{X,Y} \langle I(t_0+1) \rangle_{X,Y}} - 1 \right], \quad (2)$$

donde  $I(t_0)$  es la intensidad promedio al tiempo  $t_0$ , el cual representa la suma de todos los elementos de la matriz  $I(X, Y, t_0)$  promediado sobre los N pixeles.  $\beta$  es un factor de normalización debido a que, en la práctica, la recolección de imágenes con la CCD se ve afectada por el ruido de la dependencia temporal y de pixeles, así como de la iluminación no uniforme que depende del sistema óptico del arreglo experimental debido a los cambios en la potencia del láser; este factor es obtenido mediante el cálculo de la autocorrelación del primer cuadro consigo mismo, permitiendo a la función de autocorrelación ser acotada exactamente entre cero y uno.

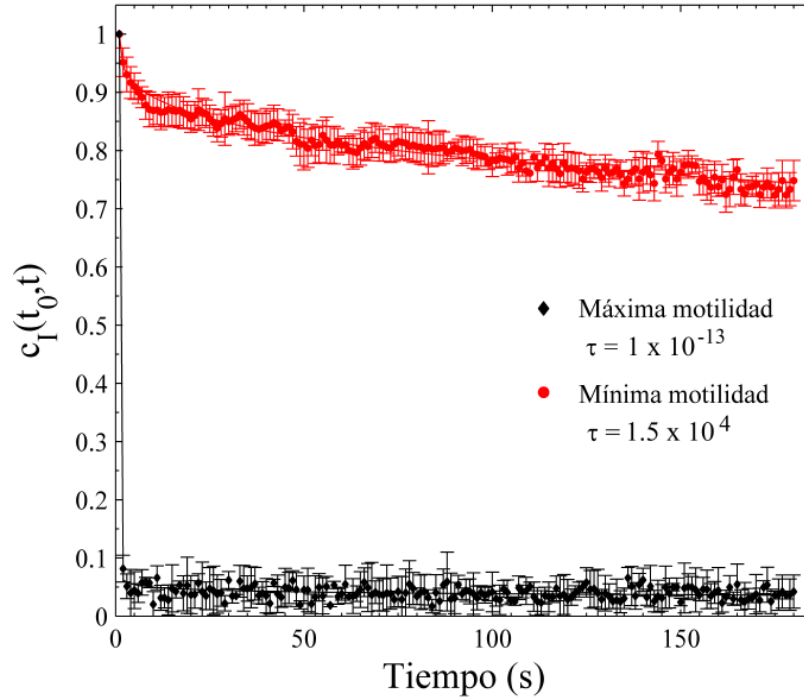


**Figura 3. 2 Ejemplo de una secuencia de imágenes de un patrón de dispersión simple.** (A) El primer cuadro ( $t_0$ ) es comparado con el resto de las imágenes uno a uno ( $t_n$ ). (B) Se toma un recuadro de 100x100 pixeles de la parte central de cada imagen como una matriz de intensidad la cual es procesada por la Ec. 2.

En la Figura 3.3 se muestran, a modo de caracterización, los parámetros de motilidad  $\tau$  máximos y mínimos registrados por el sistema que utilizamos. El máximo representa la motilidad con la que se encuentra la solución inicialmente y el mínimo representa



la no-motilidad, luego de haber intoxicado las células con azida de sodio al 0.5% ( $NaN_3$ ).

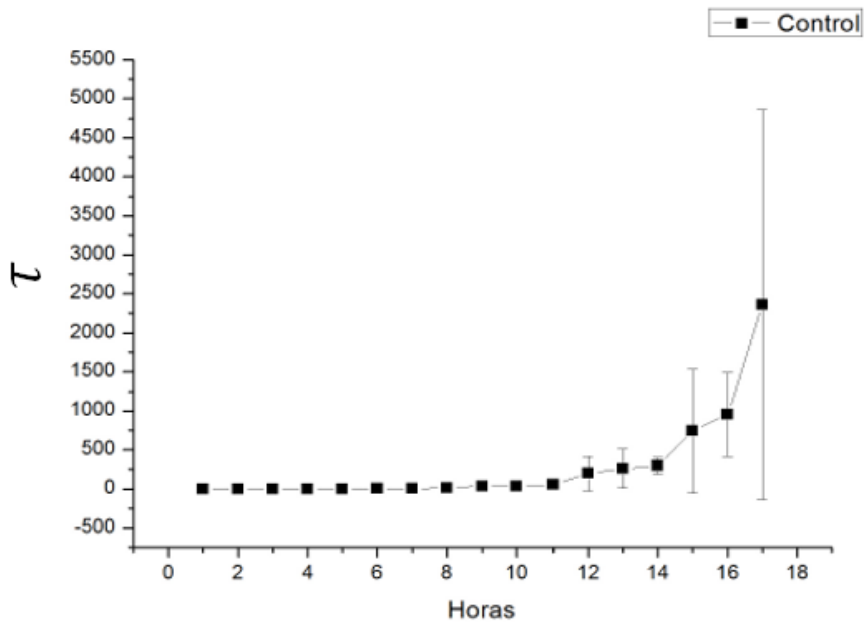


**Figura 3. 3 Curvas de autocorrelación.** Curvas de autocorrelación de los extremos de máxima y mínima motilidad, donde se caracterizan los órdenes de magnitud de los parámetros de motilidad ( $\tau$ ).

Debido a que la curva de autocorrelación obtenida muestra un decaimiento exponencial, se realizó un ajuste teórico a una exponencial extendida:

$$c_I(t_0, t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)^\alpha, \quad (3)$$

donde  $\alpha$  toma valores entre 0.05 a 0.3 y  $\tau$  es tomada como parámetro de motilidad (Figura 3.4).



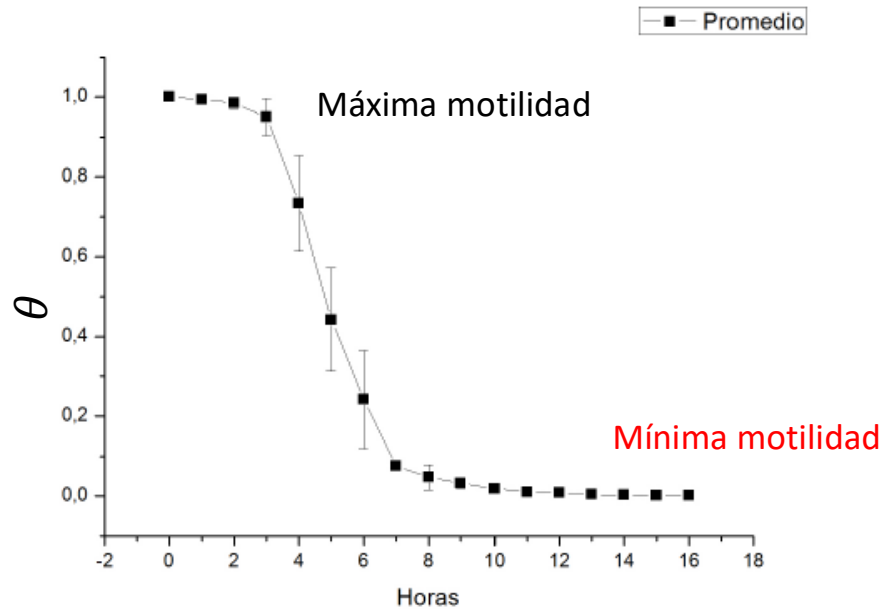
**Figura 3. 4 Experimento control a 10°C.**  $\tau$  es utilizado para mostrar el comportamiento de la motilidad realizando el ajuste a una exponencial extendida. Un valor pequeño de  $\tau$  se debe a una autocorrelación baja, (los espermatozoides aun presentan motilidad) y valor muy grande de  $\tau$  se debe a una autocorrelación cercana a uno (los espermatozoides están perdiendo motilidad).

Debido al hecho de que  $\tau$  va de números muy pequeños ( $\sim 10^{-5}$  s) a casi 1 s, es necesaria una función que pueda mostrar de manera más simple un parámetro de la prevalencia de la motilidad. La función utilizada fue:

$$\theta = \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^5}, \quad (4)$$

donde  $\tau_0=1$  es empleado solamente para eliminar las unidades temporales. Si  $\theta$  es igual o cercano a uno (pequeños valores de  $\tau$ ), se tiene un máximo de la motilidad y si  $\theta$  es igual o cercano a cero (altos valores de  $\tau$ ) la muestra no presenta motilidad o

una motilidad mínima. Cabe recalcar que nuestro método mide la motilidad de toda la muestra y no solo la motilidad de una pequeña población de células aisladas como otras técnicas de microscopía. El exponente 5 de la función fue seleccionado para minimizar el ruido que presentan los datos. Este exponente fue usado tanto en el análisis de los controles y las muestras irradiadas (Figura 3.5.)



**Figura 3. 5 Parámetro de la prevalencia de la motilidad.** Ejemplo de la representación de la motilidad aplicando la función (4) con valores entre 0 y 1, donde los valores cercanos a 1 denotan una máxima motilidad mientras que los valores cercanos a 0 una baja motilidad.

### 3.3 Medición del incremento de ROS.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas durante la reducción de oxígeno en la respiración aeróbica y por varios sistemas enzimáticos dentro de la célula. A niveles fisiológicos, se sabe que las ROS contribuyen a la señalización celular en el espermatozoide de mamífero. Un aumento en la generación de ROS, por encima de la capacidad biológica de reducción, resulta en estrés oxidativo y daño celular.

Como se mencionó en la introducción, diversos autores mencionan el incremento de ROS como un efecto producido por la exposición a la luz visible. Por esta razón

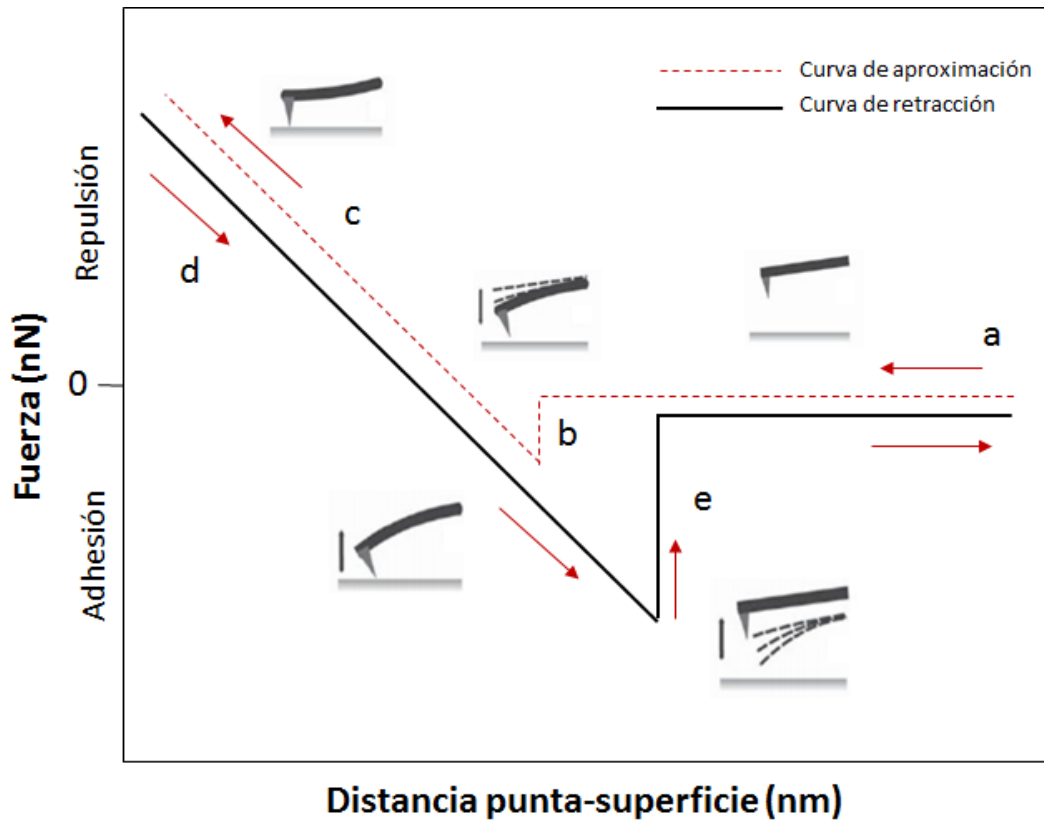
decidimos hacer un estudio del incremento de ROS en espermatozoides de ratón irradiados con luz verde a la misma tasa de dosis que se utilizó en los experimentos de prevalencia de motilidad a 37°C y 10°C. Se tomaron imágenes en un microscopio confocal (Leica) y se midió la intensidad de fluorescencia de espermatozoides irradiados y no irradiados. Se usó el kit comercial “Fluorometric Intracelular ROS kit” (Sigma Aldrich, MAK142), el cual puede ser utilizado con el filtro Cy5. Este kit permite detectar ROS intracelular (especialmente anión superóxido y radicales de hidróxilo) en células vivas después de una hora de incubación. Las muestras fueron incubadas con el compuesto fluorescente añadiendo 1 µl por mililitro durante 1 hora a 37°C y 10°C, según el experimento correspondiente. Para la temperatura de 37°C se utilizaron 3 ratones, en el experimento se separaba la muestra en grupo control, el cual se dejaba en total oscuridad, y grupo irradiado. Al pasar 1 hora se tomaba muestra de los dos grupos y se procedía a tomar fotografías de fluorescencia a 15 espermatozoides por grupo. Los experimentos a 10°C se realizaron bajo el mismo esquema, sólo que las muestras se tomaban a las 2 horas, esto para ver si al irradiar por más tiempo se observaba un incremento en la fluorescencia. Para descartar que el incremento de ROS fuera producido por la diferencia de temperatura, se realizó un experimento donde la muestra se dividía en 2 grupos, el primero grupo era irradiado a una temperatura de 37°C mientras que el otro grupo fue irradiado a la temperatura de 10°C, se tomaron fotografía de fluorescencia a los 30 y 60 min de irradiación.

### 3.4 Medición de las propiedades elásticas del espermatozoide por medio de AFM.

Debido a que no se sabe con claridad el mecanismo por el cual actúa la luz visible y por el antecedente en el que la luz visible provoca un cambio estructural en las proteínas, nos pareció interesante explorar si también había un efecto en las propiedades elásticas de la membrana plasmática.

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica experimental que nos permite obtener imágenes de la topografía de diferentes muestras a nivel microscópico. Otra característica que tiene esta técnica es la capacidad de estudiar propiedades mecánicas de superficies por medio de espectroscopía de fuerza (FS), la cual estudia las fuerzas de interacción moleculares entre la punta y la muestra. Este tipo de mediciones se hacen a partir de un ciclo conocido como curva de fuerza. En la Figura 3.6 se muestra el ciclo de una curva de fuerza ideal donde se mide la deflexión del cantiléver y como sabemos la constante de resorte de la punta podemos determinar la fuerza. El cantilever se acerca y no interactúa con la muestra, por lo cual no se presenta deflexión (ver Figura 3.6, punto a), al acercarse la punta empieza a sentir las interacciones Van der Waals. Estas fuerzas hacen que la punta entre en contacto con la muestra hasta llegar al punto b, donde el gradiente de la fuerza supera la constante de resorte del cantilever. Después, la punta se acerca más a la superficie provocando una deflexión positiva en el cantilever al estar en contacto físico con la muestra, en el punto c la muestra se deforma elásticamente hasta que se registra una fuerza de deflexión máxima. En el trazo d se invierte el sentido del desplazamiento y el cantilever se aleja un poco de la muestra. Se inicia el proceso de retracción de la punta del cantilever, que, debido a la fuerza de adhesión, entre la punta y la muestra, es necesaria una fuerza “pull-off” para que se rompa el contacto del cantilever con la muestra. Esta fuerza nos puede arrojar información sobre las propiedades elásticas de nuestro sistema. La forma de determinar el valor de esta fuerza de adhesión es

determinar la diferencia entre el valor de la fuerza antes de tocar la muestra y el valor en el que se desprende la punta de la muestra en el ciclo de retracción.



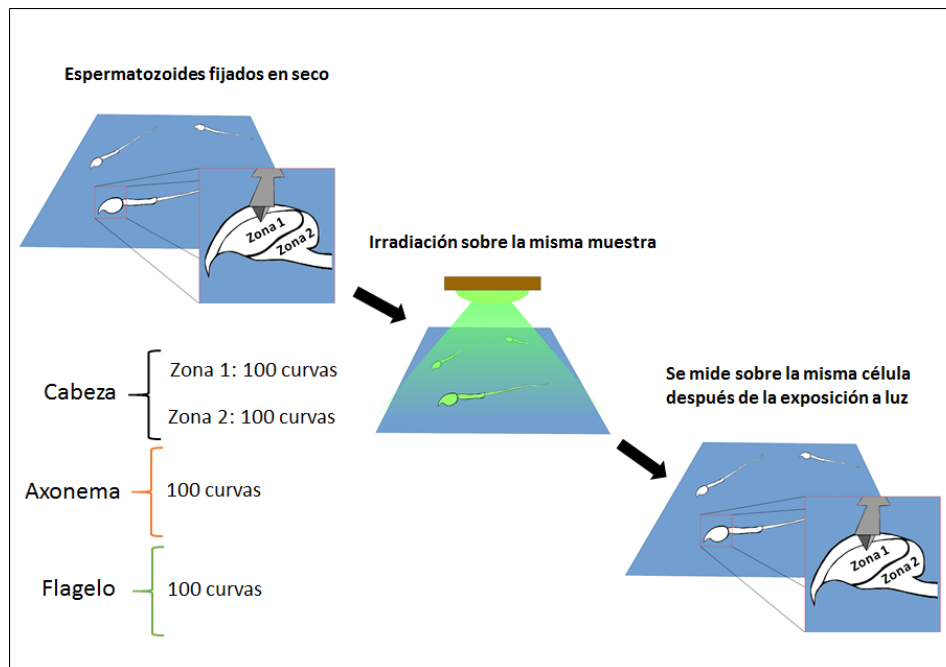
**Figura 3. 6 Ciclo representativo de una curva de fuerza.** Figura esquemática de una curva de fuerza con las diferentes regiones para la aproximación y la retracción del cantilever.

Utilizando la técnica antes descrita, se realizaron curvas de fuerza de espermatozoides en seco para determinar la fuerza de adhesión. Para fijar electrostáticamente los espermatozoides a la superficie se utilizaron cubre objetos los cuales fueron previamente cargados con solución de polietilenimina (PEI) al 8% por seis horas, para después lavarlos con agua Milli-Q y secar con gas nitrógeno. Se procedió a dejar la solución de espermatozoides sobre el cubre objetos ya tratado por 30 minutos, para después realizar lavados con agua Milli-Q y secar con gas nitrógeno de nuevo.

Para la obtención de las curvas de fuerza con AFM se usó un microscopio Innova Bruker (Santa Barbara, CA). Fue necesario antes de medir curvas de fuerza realizar

imágenes de AFM para determinar el área donde se iba a situar la punta para realizar las curvas de fuerza. Las imágenes fueron tomadas en modo contacto a una resolución de 512 píxeles/línea y a una velocidad de 1.0 Hz. El cantilever que se usó fue de silicio dopado con nitruro con un radio de curvatura nominal de 45nm y una constante de resorte de 0.350 N/m.

Las curvas de fuerza se realizaron en el mismo espermatozoide antes y después de irradiar, en un área no mayor a 5x5  $\mu\text{m}$  y con un total de 400 curvas de fuerza por experimento a una velocidad de aproximación de 70.5 nm/s (ver Figura 3.7). Para la edición de las imágenes de AFM se usó el software Gwyddion 2.50 (Czech Metrology Institute) de licencia libre. El análisis estadístico que se utilizó para estos experimentos fue una prueba t student para muestras apareadas con un valor de  $P < 0.05$ .



**Figura 3. 7. Metodología para la toma de las curvas de fuerza en el espermatozoide de ratón.** En la imagen se muestra un esquema representativo de la toma de las curvas de fuerza. Se fijaron las células a un cubre objetos y se midieron curvas de fuerza en modo contacto en seco. Se eligió un espermatozoide y se procedió a medir en la cabeza 200 curvas (zona 1 y zona 2), axonema 100 y flagelo 100. Después de hacer las mediciones se irradió la muestra por una hora (luz verde o UV). Por último, se volvieron a tomar curvas de fuerza sobre el mismo espermatozoide.



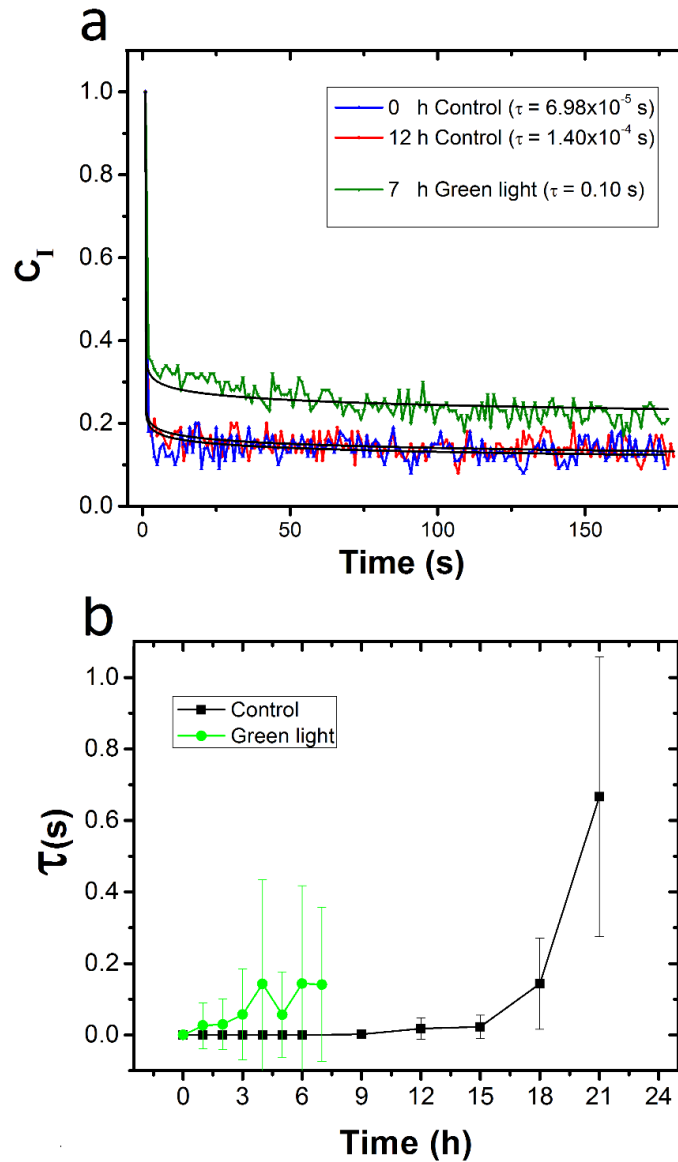


# Resultados

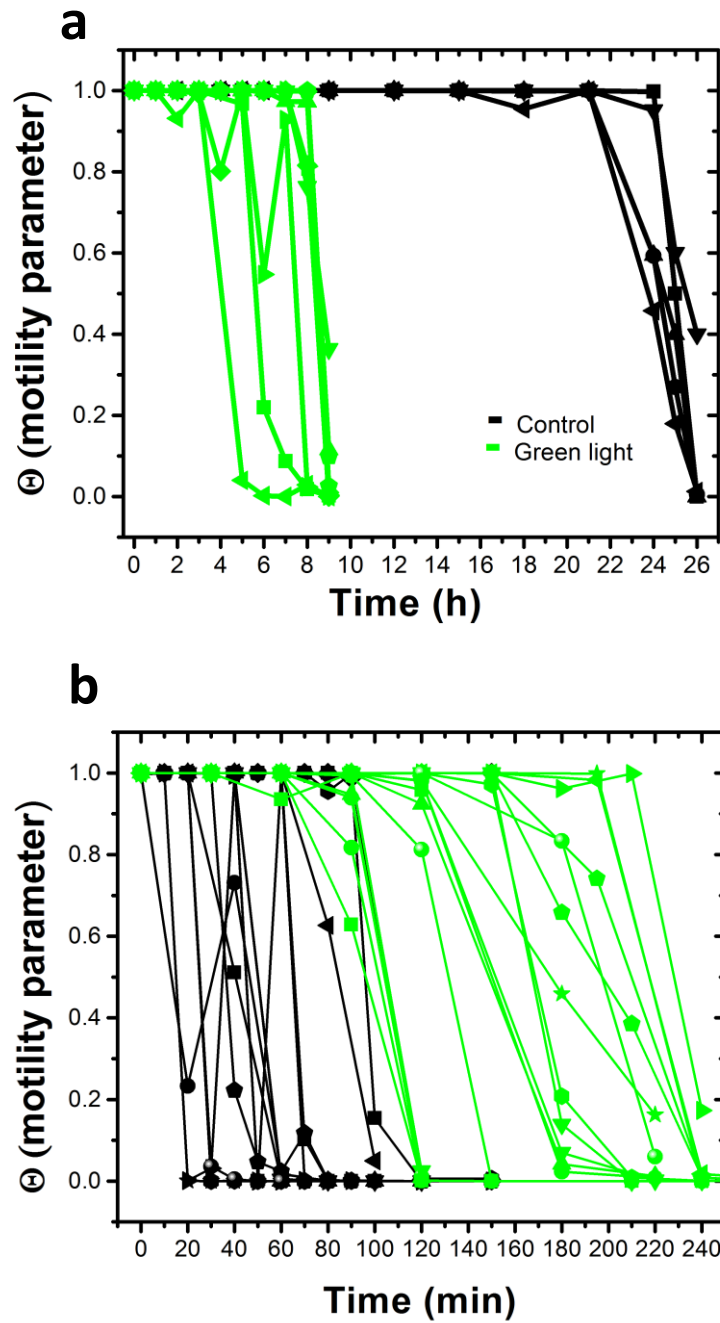
## 4.1 Efecto de la luz verde en la motilidad a diferentes temperaturas.

En la Figura 4.1a, se muestra la autocorrelación temporal de las imágenes tomadas cada segundo para una muestra control (no irradiada) a las 0 y 12 horas, así como una muestra irradiada con luz verde a las 7 horas. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 10°C. Con diferentes colores se señala la diferencia entre los valores de  $\tau$  para cada una de las autocorrelaciones y se observa que la muestra que ha sido irradiada tiene una mayor autocorrelación temporal (color verde), así mismo un valor de  $\tau$  mayor. Esto nos habla de que nuestra muestra presenta una baja motilidad en comparación con las otras dos curvas (color azul y rojo), que presentan una baja autocorrelación y un valor de  $\tau$  muy pequeño, o sea que las muestras presentan una alta motilidad. En la Figura 4.1b, se encuentran graficados los valores de  $\tau$  obtenidos de las curvas de autocorrelación a 10 °C. En la gráfica de la Figura 4.2 se muestra el parámetro de motilidad  $\Theta$  obtenidos a una temperatura de (a) 10°C y (b) 37°C como función del tiempo para espermatozoides expuestos a luz verde (líneas verdes) y espermatozoides no irradiados (líneas negras). Cada experimento es representado por diferente símbolo, además de que cada valor de  $\Theta$  fue obtenido del promedio de 6 mediciones de  $\tau$ , cada una de ellas calculadas con el estimador de la autocorrelación de la Ecuación (3). Podemos observar el comportamiento entre la máxima y nula motilidad de cada experimento. Aunque las mediciones muestran gran variabilidad, a simple vista se observa que existen dos tendencias características en nuestros experimentos. Además, nuestro sistema nos da un resultado representativo de una población, esto quiere decir que nuestras mediciones no son tomadas de pequeñas muestras, que en ocasiones no pueden representar el comportamiento

general del sistema. Por esta razón nos pareció más conveniente estudiar primero el comportamiento total de la muestra, en vez de realizar una caracterización de los parámetros motilidad de pequeñas muestras.

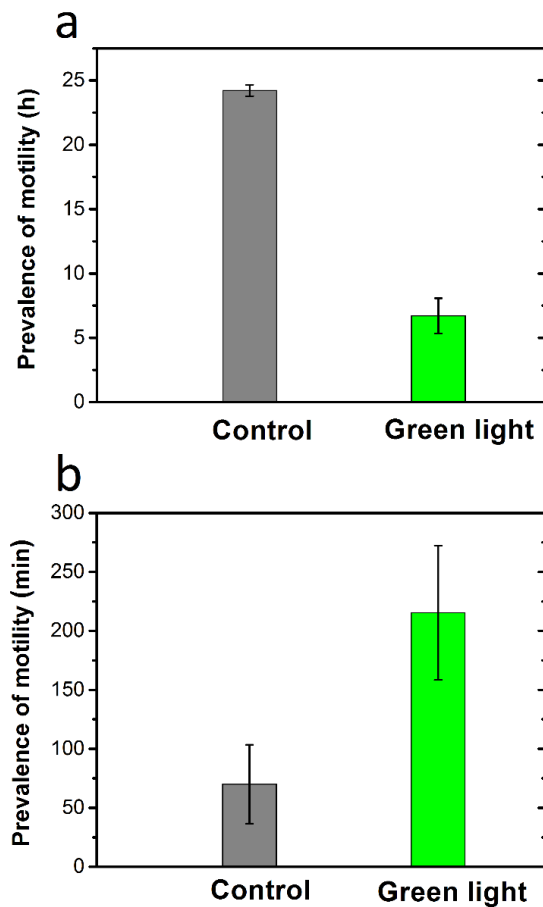


**Figura 4. 1 Autocorrelación temporal y valores de  $\tau$  de un experimento a 10°C.** (a) Autocorrelación temporal generada por la motilidad de espermatozoide de ratón irradiado con luz verde y su control correspondiente a 10°C. En el inicio del experimento ( $t= 0$ ), las muestras con espermatozoides producen valores pequeños de autocorrelación, lo que significa alta motilidad. Después de 7 horas, la motilidad de las muestras irradiadas decrece, mientras que las muestras control presentan motilidad hasta 12 horas después de haber comenzado el experimento. Lo valores de "R-square" del ajuste son: 87, 88 y 85% para la curva azul, roja y verde, respectivamente. (b) El comportamiento temporal de la motilidad celular de los espermatozoides irradiados y no irradiados a 10°C, donde  $\tau$  crece de manera más rápida para las muestras irradiadas.



**Figura 4. 2** Parámetro de motilidad  $\Theta$ . Parámetro de motilidad  $\Theta$  como función del tiempo calculado usando la Ecuación 4 para espermatozoides expuestos a luz verde a una temperatura de (a) 10 °C y (b) 37 °C. Cada experimento es representado por diferente símbolo, además de que cada valor de  $\Theta$  fue obtenido del promedio de 6 mediciones de  $\tau$ .

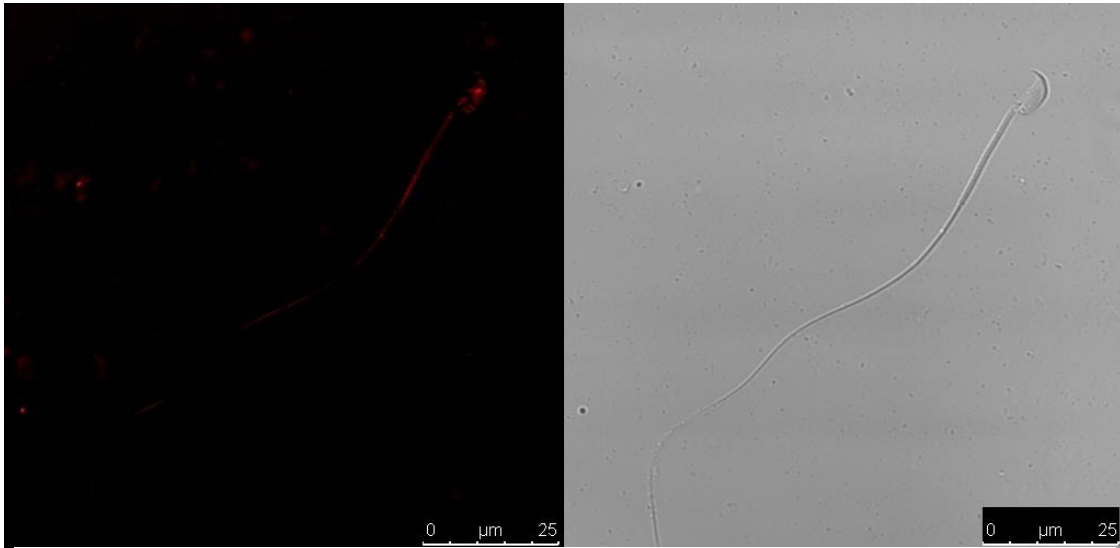
En nuestros resultados se observa que la motilidad de los espermatozoides a 10°C prevalece hasta 26 horas aproximadamente (también fue verificado en el microscopio). Esto contrasta con los experimentos a 37°C donde la motilidad dura hasta 150 minutos aproximadamente. Sin embargo, cuando los espermatozoides son expuestos a luz verde, dos efectos opuestos ocurren: la prevalencia de la motilidad a 10°C se reduce de 26 a 9 horas, mientras que, en los experimentos a 37°C, aumenta de 75 a 225 min. Estos resultados son presentados en las gráficas de barras de la Figura 4.2 donde se observa que la prevalencia de la motilidad decrece un 63% con respecto al control a 10°C, mientras que incrementa un 300% a 37°C.



**Figura 4. 3** Prevalencia de la motilidad en espermatozoides de ratón expuestos a luz verde a 10°C (a) y 37°C (b). La altura de las barras corresponde al tiempo promedio en el cual las células dejaron de moverse ( $\theta=0$ ). Los errores son la desviación estándar (n= 5 en a y n=10 en b)

## 4.2 Efecto de la luz verde en la producción de ROS.

En la Figura 4.4, se muestra el tipo de imagen que obtuvimos con microscopía confocal para observar fluorescencia provocada por ROS. Las imágenes mostradas pertenecen a un espermatozoide irradiado con luz verde a 10°C. La fluorescencia se observa a lo largo de todo el espermatozoide, presentando una fuerte intensidad en la cabeza y en el axonema.

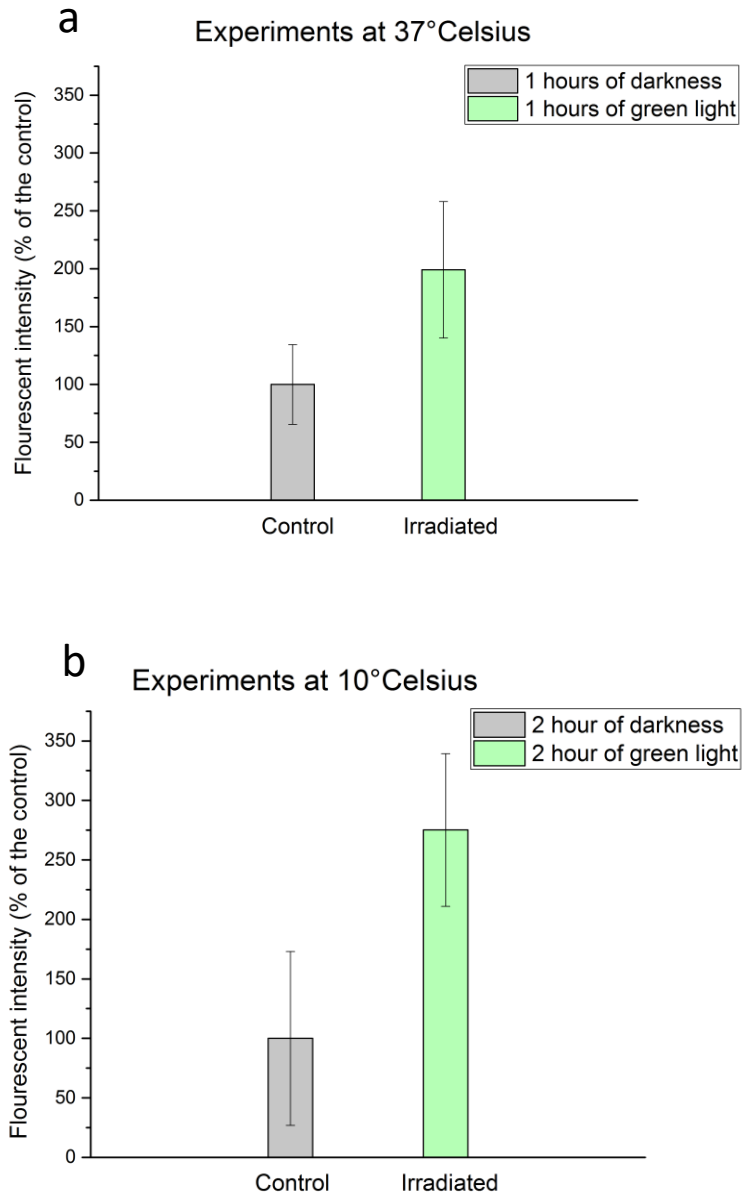


**Figura 4. 4 Imagen de fluorescencia obtenida en el confocal.** El espermatozoide pertenece a una muestra que fue irradiada con luz verde por dos horas a 10°C.

A partir de este tipo de imágenes se realizó un análisis de la intensidad de fluorescencia en todo el espermatozoide. Para cada grupo se escogieron 15 espermatozoides en los cuales se determinó la intensidad de la fluorescencia por medio del software de licencia libre ImageJ.

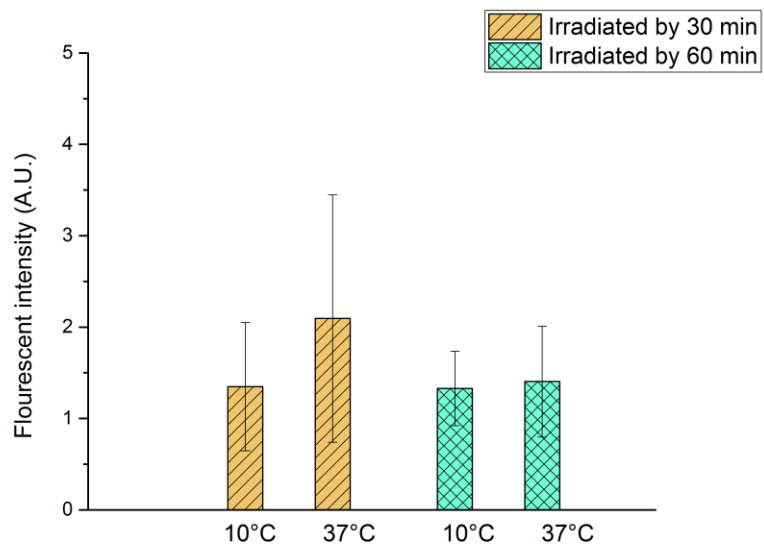
En la gráfica de la Figura 4.5a, se muestra la intensidad de fluorescencia medida después de 1 hora de incubación a 37°C de espermatozoides control (sin irradiar) y espermatozoides expuestos a luz verde. Los resultados señalan que existe un incremento de ROS debido a la exposición de luz verde. La Figura 4.5b corresponde a la intensidad de fluorescencia medida después de dos horas de incubación a 10°C de espermatozoides control y expuestos a luz verde, es claro que también se observó un incremento de ROS en la célula, además de que el incremento fue mucho mayor que

en el experimento a 37°C. Los resultados de estos experimentos comprueban que la exposición de luz verde estimula el incremento de especies reactivas de oxígeno y que este incremento posiblemente es proporcional al tiempo de exposición.



**Figura 4. 5. Resultados de las mediciones de intensidad de fluorescencia a 37°C y 10°C.** En el eje de las y tenemos la intensidad de fluorescencia normalizada al control medida 1 hora bajo la exposición de luz verde y 1 hora en total oscuridad a 37°C (a). En la parte inferior se muestra la intensidad de fluorescencia normalizada al control medida 2 horas bajo la exposición de luz verde y 2 horas de total oscuridad (b). Se tomaron imágenes de 15 espermatozoides por ratón y se promedió la intensidad de fluorescencia. La desviación estándar corresponde a los promedios de 5 ratones por temperatura.

Para descartar la opción de que el incremento de especies reactivas de oxígeno en nuestros experimentos fuera provocado también por la temperatura de incubación, se muestran los resultados de mediciones de intensidad de fluorescencia a diferentes temperaturas y con el mismo tiempo de exposición. En la gráfica de la Figura 4.6 se observa que no hay diferencia significativa en los niveles de ROS si se irradia a diferentes temperaturas y el mismo tiempo de exposición, esto nos dice que el incremento de ROS en nuestro sistema es únicamente provocado por la irradiación con luz verde y no por algún estrés térmico.



**Figura 4. 6 Resultados de la medición de intensidad de fluorescencia a diferentes temperaturas.** Gráfica de barras de la intensidad de fluorescencia a diferentes temperaturas de la misma muestra y con el mismo tiempo de exposición. Color amarillo son los experimentos irradiados por 30 min. Verde son los experimentos irradiados por 60 min. Los resultados mostraron que el efecto no es provocado o aumentado por la temperatura. Se tomaron imágenes de 15 espermatozoides por ratón y se promedió la intensidad de fluorescencia. La desviación estándar corresponde a los promedios de 3 ratones para cada tiempo de irradiación.

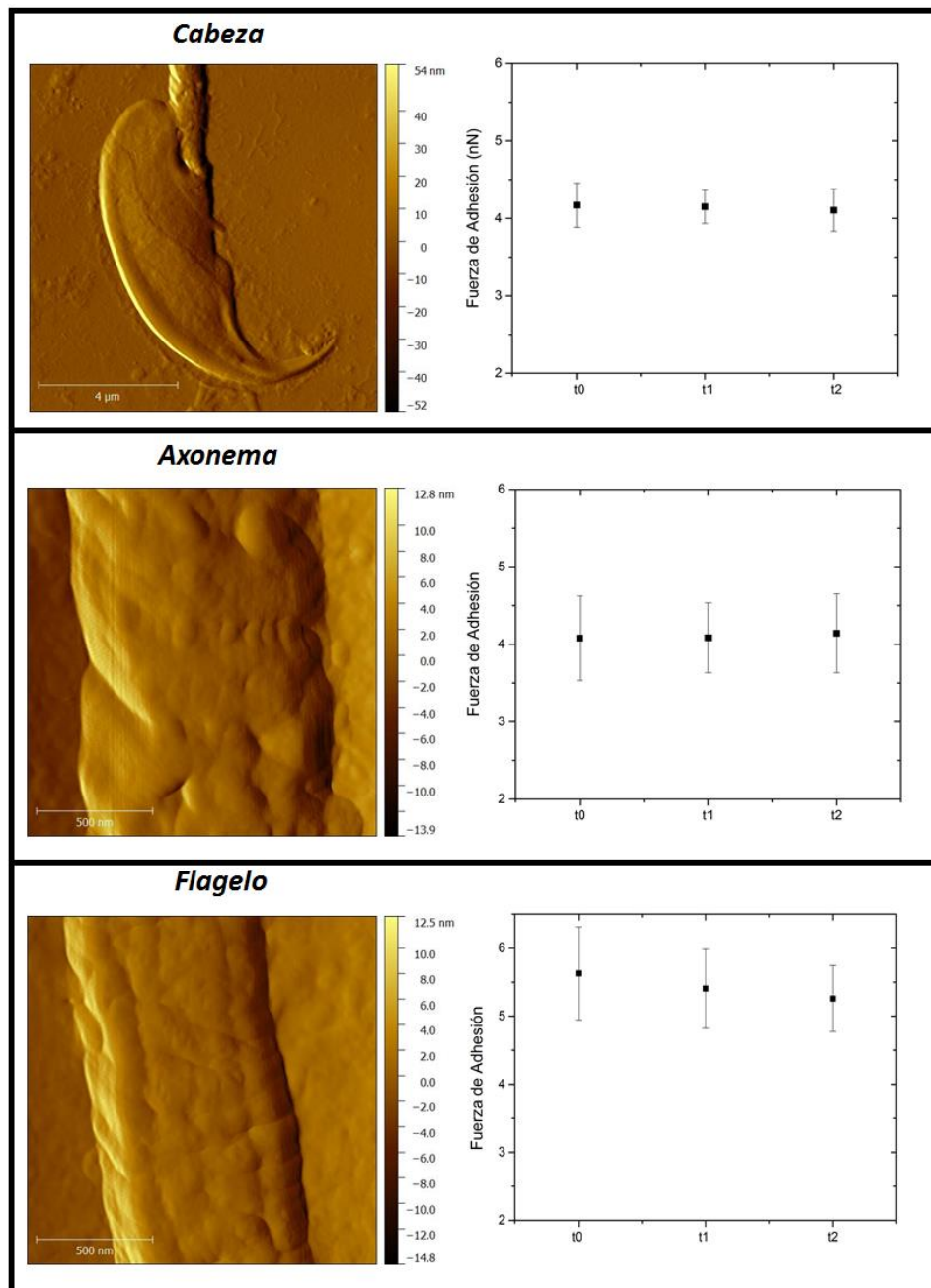
### 4.3 Efecto de la luz verde en las propiedades elásticas del espermatozoide de ratón.

En la Figura 4.7, se muestran imágenes de AFM de las principales estructuras que conforman el espermatozoide de ratón. Para realizar el estudio de las fuerzas de adhesión, fue necesario primero capturar imágenes para marcar los lugares específicos donde se tomarían las curvas de fuerza. Debido a que las fuerzas de adhesión son en el orden de nano-newtons y que los cambios que podríamos obtener con la técnica son muy pequeños, medimos el cambio de las fuerzas de adhesión en función del tiempo, esto para descartar un efecto provocado por la deshidratación de la muestra. En la Figura 4.6, no se observan cambios significativos en las fuerzas de adhesión medidas en las tres estructuras principales del espermatozoide a las 0, 5 y 24 horas. Debido a que la ventana de tiempo de nuestros experimentos de AFM no es mayor a 4 horas y que aun a las 5 horas no se observaron cambios significativos, podemos asegurar que los posibles efectos observados no son debido a la deshidratación.

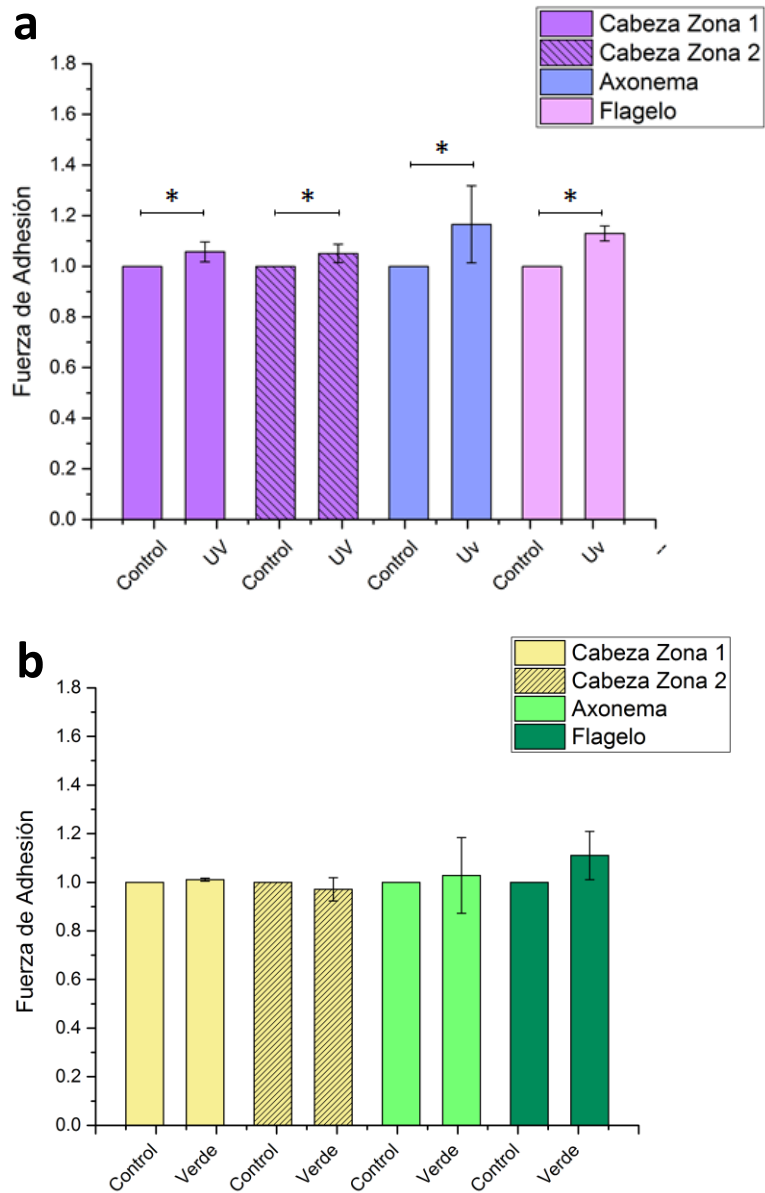
Ya que sabemos que la luz UV desnatura las proteínas, nos interesaba saber si esto afecta las propiedades elásticas de la membrana plasmática del espermatozoide. Fue por ello que se procedió a realizar un control negativo con luz ultravioleta. En la Figura 4.7a, observamos el aumento de la fuerza de adhesión de las diferentes estructuras del espermatozoide de ratón, aumentando de manera más considerable en el axonema y el flagelo. Esto nos dice que la célula se volvió más elástica, lo cual puede ser provocado por las proteínas desnaturadas de la membrana plasmática. Cada valor de fuerza de adhesión fue normalizado con su control. Estos resultados corresponden a las mediciones de 5 espermatozoides, cada uno de diferente ratón, donde se tomaron curvas de fuerza del mismo espermatozoide antes y después de irradiar por una hora con luz UV. En la Figura 4.7b observamos los resultados de los experimentos realizados con luz verde, donde se usó la misma metodología y se



aseguró que la intensidad de luz de exposición fuera la misma. En esta gráfica no se observan cambios significativos producidos por la exposición de luz verde.



**Figura 4. 7. Experimentos con AFM, evolución temporal.** Izquierda: imágenes de AFM topográficas de las diferentes estructuras del espermatozoide. Derecha: Evolución temporal de la fuerza de adhesión. Las mediciones fueron tomadas a las 0, 5 y 24 horas (t0, t1 y t2 correspondientemente). Cada punto es el promedio de un espermatozoide de tres diferentes ratones.



**Figura 4. 8. Histogramas de las fuerzas de adhesión.** El histograma superior (a) corresponde a la fuerza de adhesión normalizada con respecto al control de muestras irradiadas con UV, esto se tomó como control negativo. En la gráfica de la parte inferior se muestra el histograma de la fuerza de adhesión de muestras irradiadas con luz verde normalizadas a su correspondiente control. N=6 para los experimentos con UV y N= 5 para experimentos con luz verde. (\*P<0.05)



# Discusión

Como ya hemos visto anteriormente, la luz visible afecta la motilidad del espermatozoide. Aunque aún no está elucidado por completo el mecanismo por el cual la luz interactúa con las células, se sugiere en la literatura más de una posible hipótesis capaz de explicar los efectos de la irradiación con luz visible en el espermatozoide. Una de las hipótesis sugeridas recae en el hecho de que la luz visible interactúa con células debido a que éstas contienen fotosensibilizadores. Los fotosensibilizadores endógenos potenciales que absorben en el rango de la luz visible son porfirinas, citocromos (especialmente citocromo c oxidasa), cofactores de piridina, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), clústers de Fe-S y flavinas [57, 58, 59, 60, 61, 62, 63]. Los fotosensibilizadores de la célula tienen la capacidad de absorber la energía de los fotones y transferirla a moléculas que se encuentren relativamente cerca [64]. Debido a que en la mitocondria existen gran variedad de estos fotosensibilizadores, la luz visible estimula la producción de un potencial electroquímico extra y esto a su vez incrementa la síntesis de ATP. Este mecanismo ya ha sido estudiado en espermatozoides de mamífero [65]. En 1992 Lubart et al. propusieron por primera vez que este incremento en la síntesis de ATP es debido al potencial electroquímico generado que se transforma en energía protón-motriz en la mitocondria. Esto se puede llevar a cabo por dos vías, activación de la cadena respiratoria en la mitocondria por la formación de oxígeno singlete a través de porfirinas endógenas y por el disparo de reacciones redox en la cadena respiratoria por la excitación de cromóforos [56].

Cuando se irradia con luz visible, la primera respuesta de la célula es la formación de ROS por medio de la excitación electrónica de los fotosensibilizadores endógenos en ésta. Lo anterior provoca un aumento en la actividad de la cadena respiratoria y en el potencial de membrana a través de la membrana interna de la mitocondria que oxida los depósitos de NAD y altera el estado redox de la mitocondria y el citosol. Todos

estos cambios incrementan la producción de ATP y regulan otras respuestas a largo plazo en células somáticas, por ejemplo, la síntesis de RNA, el crecimiento y proliferación celular [91].

También es ampliamente aceptado que existe una relación entre el flujo de  $Ca^{2+}$  y la generación de especies reactivas de oxígeno. Esta relación puede ser promovida o restringida por diferentes aspectos, incluyendo el tipo de célula y sus fotosensibilizadores endógenos [55]. Esto se puede dar por los cambios en el estado redox que alteran el transporte activo de  $H^+$ , que a su vez provocan un cambio en la relación  $Na^+ : H^+$  afectando las concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$ . El aumento del potencial membranar de la mitocondria altera los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico ya que, por un lado, aumenta la actividad de las bombas dependientes de ATP que captan  $Ca^{2+}$  del espacio extracelular y, por el otro, aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$  [66]. Se sabe que el transporte de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial está energéticamente acoplado al transporte de electrones. Estos cambios inducidos por luz en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, podrían contribuir a explicar el aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal observados en diferentes especies [42, 67].

La luz visible no sólo afecta a fotosensibilizadores de la mitocondria. Recordemos que la membrana plasmática cuenta con el sistema NADPH oxidasa, el cual es un complejo transmembranar que contiene fotosensibilizadores, tales como las flavinas. Este complejo es capaz de producir anión superóxido y cuando es activado puede llegar a destruir patógenos en células fagocíticas. Esto ha despertado el interés de estudiar su papel en la respuesta del espermatozoide al ser irradiado [68].

Todo lo discutido anteriormente cae en la idea principal de la hipótesis que podría explicar los efectos de la luz visible en espermatozoide de ratón; ésta es que la luz incrementa el contenido de ATP en el espermatozoide y este aumento de energía se ve reflejado como un aumento en la motilidad. Coincidiendo un poco con esta idea, un estudio reciente encontró que la radiación luminosa de espermatozoide de

humano con luz visible incrementa HAM a través de  $Ca^{2+}$  y la activación de PKA mediado por ROS, los cuales fosforilan el proto-oncogen tirosina-quinasa (SRC). La proteína SRC subsiguientemente fosforila el factor de crecimiento epidermal y gelsolina. La activación de estas proteínas por medio de la fosforilación incrementa la polimerización de actina e induce la hiperactivación del espermatozoide [46].

Una característica de los sistemas estudiados en la literatura es que la mayoría de los experimentos son llevados a cabo a 37°C. En nuestros experimentos abordamos además el efecto de la luz verde a 10°C, teniendo como antecedente un trabajo previo en nuestro laboratorio donde se encontró que esta temperatura promueve las condiciones ideales para que la motilidad prevalezca por más tiempo [52]. Por lo tanto, si los mecanismos que participan en el espermatozoide siguen siendo funcionales a 10°C, esto debido a que los espermatozoides no pierden la motilidad, sería lógico pensar que la luz verde también extendería por más tiempo la motilidad como en los experimentos a 37°C. Una importante característica de nuestro arreglo experimental es que las muestras se irradiaban hasta que dejaran de presentar motilidad.

En los experimentos a 37°C se observó un aumento de la prevalencia de motilidad y un incremento en la producción de ROS cuando se irradia con luz verde. Este resultado está de acuerdo con más de uno de los mecanismos propuestos en la literatura, ya que la irradiación con luz visible es asociada a la estimulación de ROS que a su vez puede generar un incremento en la síntesis de ATP en el sistema. Sin embargo, nuestros resultados a 10°C, en los que hubo una disminución de la prevalencia de la motilidad con respecto a la muestra control y así mismo también un aumento en la producción de ROS, contradicen esta hipótesis, debido a que, aunque se esté generando ROS en el sistema y esto aparentemente promueve la síntesis de ATP, observamos que decrece la prevalencia hasta en un 63% respecto a la muestra control. Cabe recalcar que el incremento en la producción de ROS fue mayor en los experimentos a 10°C, debido al tiempo de duración de nuestras mediciones. Esto quiere decir que esta diferencia de concentración de ROS en los experimentos de 37°C

y 10°C fue porque la muestra de 10°C se irradió por más tiempo. Entonces, si nuestro sistema a 10°C fue estimulado con luz verde por más tiempo y si los mecanismos descritos anteriormente se estuvieran llevando a cabo incrementando la síntesis de ATP, se esperaría que también la prevalencia de la motilidad aumentara respecto a la muestra control. Una explicación pudiera ser que la temperatura baja afecta estos procesos, sin embargo, que la muestra control siga presentando motilidad es prueba de que estos mecanismos, entre otros, no son sensibles a esta temperatura.

La producción de ROS en el espermatozoide puede ser generada por su actividad metabólica normal. El espermatozoide de humano genera anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) el cual es espontáneamente dismutado a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) [70, 71]. Debido a su baja reactividad y corta vida media (1ms), el  $O_2^{\bullet-}$  no es muy dañino, aunque si reacciona puede producir especies más tóxicas como los radicales de tiol. Sin embargo,  $H_2O_2$  es relativamente estable y tiene un mayor potencial oxidante y al no estar cargado puede atravesar libremente las membranas celulares. Las muy bajas concentraciones de hierro presentes en casi cualquier solución son suficientes para catalizar la formación radical de hidroxilo ( $\bullet OH$ ),  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ ; estas ROS reaccionan prácticamente con cualquier componente celular y los efectos tóxicos observados están limitados sólo por su tiempo de vida corta (1ns) [72].

Las moléculas que secuestran las ROS (ROS scavengers) provocan un efecto antioxidante en la célula. El espermatozoide y el plasma seminal cuenta con un conjunto de “ROS scavengers”, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) [71, 73], catalasa [74] y el sistema glutatión peroxidasa [75]. Otras sustancias con actividades similares a SOD en el espermatozoide son  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico [72], piruvato [76], taurina, hipotaurina y albúmina [77]. Por lo anterior, el efecto de la luz verde observado en el espermatozoide de ratón en nuestros experimentos puede deberse al balance entre la producción de ROS y los “ROS scavengers” que los atrapan. Una producción excesiva de ROS puede alterar este balance comprometiendo las funciones del espermatozoide. Podemos decir que en nuestros experimentos a 37°C este balance no se ve afectado y el incremento de ROS es el

adecuado para participar de manera positiva en los mecanismos anteriormente mencionados, así como promover la prevalencia de la motilidad; sin embargo, en nuestros experimentos a 10°C, debido a que el incremento de ROS es mayor por el tiempo de irradiación prolongado, este balance se ve afectado de tal manera que los “ROS scavengers” ya no son suficientes para atrapar el exceso de ROS generado, provocando una disminución de la prevalencia de la motilidad respecto a la muestra control.

Otra hipótesis más reciente sobre el efecto de la luz visible recae en la interacción de ésta con las proteínas. J. Espinoza et al. encontraron que la irradiación con luz roja y luz verde induce cambios conformacionales ovoalbúmina y beta-cristalina [11]. Lubart et al. (1997) supone que la excitación por armónicos vibratorios podría ocurrir en respuesta a la luz visible [78]. Como resultado, las proteínas que no son cromóforos pueden experimentar cambios conformacionales que pueden inhibirla o activarla. Esta hipótesis podría explicar por qué la irradiación de la luz a 780 nm inhibe la captación de  $Ca^{2+}$  en las mitocondrias, lo que podría resultar de la inhibición de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. Además, la estimulación de luz visible también podría conducir a cambios conformacionales de proteínas plasmáticas involucradas en el transporte de  $Ca^{2+}$ , alterando así su capacidad de unirse a éste. Si la irradiación con luz incrementara la unión de  $Ca^{2+}$  a estas proteínas, se aumentarían los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en la célula [79]. Nosotros estudiamos el posible cambio en las propiedades elásticas del espermatozoide de ratón provocado por el cambio conformacional de proteínas al ser irradiadas con luz verde por medio de AFM, se optó por hacer este estudio en seco debido a que queríamos dejar de lado la posible contribución de las vías de señalización que se reportan. No encontramos diferencia significativa en las propiedades elásticas del espermatozoide al irradiar con luz verde (aunque un poco en el flagelo); sin embargo, sí encontramos que al irradiar con luz UV a la misma dosis, hay un aumento significativo en la fuerza de adhesión en toda la estructura del espermatozoide. Este resultado con luz UV puede ser debido a la desnaturalización de las proteínas de la membrana plasmática, provocando un



estado más desordenado en la membrana, por ende, una mayor fuerza de adhesión y que la muestra pierda rigidez. En nuestros resultados con luz verde al no encontrar cambio en la rigidez de la célula, pudiera ser que los cambios conformacionales que se den no sean tan grandes para la resolución de nuestra técnica de estudio. Cabe recalcar que en los estudios de AFM, sólo nos permitieron estudiar el efecto de la luz verde dejando a un lado el papel de la temperatura.

# Conclusiones

En el presente trabajo se estudió el efecto de la luz verde en espermatozoides de ratón en la prevalencia de la motilidad a 37°C y 10°C, empleando una técnica óptica que se basa en el cálculo de la autocorrelación temporal. Por medio de microscopía de fluorescencia se determinó si hay un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno como resultado de la exposición a la luz verde a ambas temperaturas.

Encontramos que el efecto de la luz verde en la prevalencia de la motilidad en espermatozoide de ratón depende de la temperatura y del tiempo de irradiación. A 37°C la luz verde tiene un efecto positivo prolongando la motilidad por más tiempo y a 10°C un efecto negativo, disminuyendo considerablemente la prevalencia de la motilidad. Así mismo, de acuerdo con lo observado en los experimentos de fluorescencia donde a 10°C se presenta una mayor concentración de especies reactivas de oxígeno debido a que el tiempo de irradiación fue mayor, los resultados en la prevalencia de la motilidad pueden ser debido a que en la muestra a 10°C se rompe el balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes (ROS scavengers). Este balance no se ve comprometido en los experimentos a 37°C, aunque si hay un incremento en ROS en la célula debido a la excitación electrónica de los fotosensibilizadores endógenos, este incremento parece ser necesario para provocar un aumento en la síntesis de ATP y a su vez promover la motilidad en el espermatozoide.

En los resultados de AFM la luz verde no provoca un cambio significativo en las propiedades elásticas del espermatozoide de ratón. Sin embargo, el control negativo con luz UV muestra un incremento significativo en la fuerza de adhesión, que se interpreta como una disminución de rigidez en la célula. Esta disminución se puede deber a las proteínas desnaturalizadas que aumentan el desorden en la estructura de la membrana plasmática. Con lo anterior, se deja abierta la posibilidad del uso de AFM

para caracterizar propiedades elásticas de materia biológica por medio de curvas de fuerza, mediciones no observadas en la literatura científica del tema.

Nuestros resultados confirman que la luz verde puede interactuar con la materia biológica y que un efecto de esta interacción es el incremento de especies reactivas de oxígeno. En nuestros experimentos, al no tener medio de capacitación, se confirma que la generación de ROS no sólo participa en vías de señalización en la motilidad hiperactivada y la capacitación.

Cabe recalcar que es probable que los efectos observados dependan de las características energéticas de cada especie. Aunque el mecanismo aún no se entiende por completo y podrían estar involucradas más de una vía de señalización, nos queda claro que el incremento de ROS forma parte de estos mecanismos. Sin embargo, es necesaria más investigación para el entendimiento de los mecanismos involucrados en la respuesta de los espermatozoides a la luz visible.

# Perspectivas

Como ya se ha mencionado anteriormente, aun no esta elucidado por completo el mecanismo por el cual interactúa la luz visible con el espermatozoide de ratón. A continuación, presentamos las perspectivas de investigación para ampliar los aportes del presente trabajo:

- Caracterizar los parámetros de motilidad del espermatozoide de ratón por la exposición a luz verde. Esto nos podría indicar si el posible mecanismo está ligado a una función específica en la motilidad.
- Estudiar el efecto de la luz verde en el flujo de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide para comprobar si la luz verde es capaz de regular de alguna forma las proteínas que captan  $Ca^{2+}$ .
- Estudiar la participación de las enzimas de superóxido dismutasa (SOD) en la captación de especies reactivas de oxígeno en espermatozoides irradiados con luz verde.
- Caracterizar por medio de AFM las propiedades elásticas del espermatozoide ante irradiación de luz UV-visible.
- Explorar otras longitudes de onda.



# Bibliografía

- [1] Kuse, Y., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., & Hara, H. (2014). Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Scientific reports*, 4, 5223.
- [2] Hori, M., Shibuya, K., Sato, M., & Saito, Y. (2014). Lethal effects of short-wavelength visible light on insects. *Scientific reports*, 4, 7383.
- [3] Karu, T. I., Tiphlova, O. A., Fedoseyeva, G. E., Kalendo, G. S., Letokhov, V. S., Lobko, V. V., ... & Meissel, M. N. (1984). Biostimulating action of low-intensity monochromatic visible light: is it possible?. *Laser Chemistry*, 5(1), 19-25.
- [4] Idil, O., Darcan, C., Ozen, T., & Ozkanca, R. (2013). The effect of UV-A and various visible light wavelengths radiations on expression level of Escherichia coli oxidative enzymes in seawater. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(3), 230-236.
- [5] Muneer, S., Kim, E. J., Park, J. S., & Lee, J. H. (2014). Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). *International journal of molecular sciences*, 15(3), 4657-4670.
- [6] Lee, N. Y., Lee, M. J., Kim, Y. K., Park, J. C., Park, H. K., Choi, J. S., ... & Kim, J. G. (2010). Effect of light emitting diode radiation on antioxidant activity of barley leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(6), 685-690.
- [7] Sohni, J., Vojisavljevic V. & Pirogova (2014). E. Progress in Electromagnetics Research Symposium. PIERS Proceedings, Taipei, China, March 25-28, 2013; Curran Associates, Inc. New York.
- [8] Klein, R. M., & Edsall, P. C. (1967). Interference by near ultraviolet and green light with growth of animal and plant cell cultures. *Photochemistry and photobiology*, 6(11), 841-850.
- [9] Organisciak, D. T., & Vaughan, D. K. (2010). Retinal light damage: mechanisms and protection. *Progress in retinal and eye research*, 29(2), 113-134.

- [10] Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D., & Cashmore, A. R. (1995). Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8423-8427.
- [11] Espinoza, J. H., Reynaga-Hernández, E., Ruiz-García, J., Montero-Morán, G., Sanchez-Dominguez, M., & Mercado-Uribe, H. (2015). Effects of green and red light in  $\beta$  L-crystallin and ovalbumin. *Scientific reports*, 5, 18120.
- [12] Guzzardella, G. A., Fini, M., Torricelli, P., Giavaresi, G., & Giardino, R. (2002). Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers in medical science*, 17(3), 216-220.
- [13] Rochkind, S., & Ouaknine, G. E. (1992). New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). *Neurological research*, 14(1), 2-11.
- [14] Kreisler, M., Christoffers, A. B., Al-Haj, H., Willershausen, B., & d'Hoedt, B. (2002). Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 30(5), 365-369.
- [15] Grossman, N., Schneid, N., Reuveni, H., Halevy, S., & Lubart, R. (1998). 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 22(4), 212-218.
- [16] Yu, W., Naim, J.O., and Lanzafame, R.J. (1995). The effect of low- level laser irradiation (LLLI) on lymphocyte proliferation and ATP production in vitro. *FASEB J.* 9, A239(abst).
- [17] Duan, R., Liu, T. C. Y., Li, Y., Guo, H., & Yao, L. B. (2001). Signal transduction pathways involved in low intensity He-Ne laser-induced respiratory burst in bovine neutrophils: A potential mechanism of low intensity laser biostimulation. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 29(2), 174-178.
- [18] Cohen, N., Lubart, R., Rubinstein, S., & Breitbart, H. (1998). Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochemistry and photobiology*, 68(3), 407-413.

- [19] Karu, T. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, 49(1), 1-17.
- [20] Alexandratou, E., Yova, D., Handris, P., Kletsas, D., & Loukas, S. (2002). Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(8), 547-552.
- [21] Friedmann, H., Lubart, R., Laulicht, I., & Rochkind, S. (1991). A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 11(1), 87-91.
- [22] Lubart, R., Wollman, Y., Friedmann, H., Rochkind, S., & Laulicht, I. (1992). Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 12(3), 305-310.
- [23] Kessel, D. (1982). Determinants of hematoporphyrin-catalyzed photosensitization. *Photochemistry and photobiology*, 36(1), 99-101.
- [24] Fraikin, G. Y., Strakhovskaya, M. G., & Rubin, A. B. (1996). The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34(2-3), 129-135.
- [25] Klebanov, G. I., Strashkevich, I. A., Chichuk, T. V., Modestova, T. M., & Vladimirov, Y. (1998). Effects of endogenous photosensitizers on the laser-induced priming of leucocytes. *Membrane & cell biology*, 12(3), 339-354.
- [26] Pottier, R., & Truscott, T. G. (1986). The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 50(3), 421-452.
- [27] Cunningham, M. L., Krinsky, N. I., Giovanazzi, S. M., & Peak, M. J. (1985). Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1(5-6), 381-385.
- [28] Kim, C. S., & Jung, J. (1992). Iron-sulfur centers as endogenous blue light sensitizers in cells: a study with an artificial non-heme iron protein. *Photochemistry and photobiology*, 56(1), 63-68.



- [29] Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G., Engel, P. C., Matthews, R. G., ... & Sullivan, P. A. (1969). The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications*, 36(6), 891-897.
- [30] Kale, H., Harikumar, P., Kulkarni, S. B., Nair, P. M., & Netrawali, M. S. (1992). Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin: B. Effect of light. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298(1), 17-23.
- [31] Laloraya, M. M., Pradeep, K. G., & Laloraya, M. (1994). Photochemical reaction sequences of blue light activated flavins: sensory transduction through free radical messengers. *Biochemistry and molecular biology international*, 33(3), 543-551.
- [32] Edwards, A. M., & Silva, E. (2001). Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 126-131.
- [33] Suzuki, Y. J., Forman, H. J., & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2), 269-285.
- [34] Purohit, S., Kumar, G. P., Laloraya, M., & Laloraya, M. M. (1994). Involvement of superoxide radical in signal transduction regulating stomatal movements. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(1), 30-37.
- [35] Davies, K. J. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB life*, 48(1), 41-47.
- [36] Kohli, R., Bose, B., & Gupta, P. K. (2001). Induction of p<sub>hr</sub> gene expression in E. coli strain KY706/pPL-1 by He-Ne laser (632.8 nm) irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 60(2-3), 136-142.
- [37] Aitken, R. J., Fisher, H. M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B., & Irvine, S. (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 47(4), 468-482.
- [38] Troiano, L., Granata, A. R., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., ... & Franceschi, C. (1998). Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental cell research*, 241(2), 384-393.

- [39] Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W. N. P., Boros, L. G., Fernández-Novell, J. M., ... & Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS letters*, *554*(3), 342-346.
- [40] Turner, R. M. (2005). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, *18*(2), 25-38.
- [41] Iaffaldano, N., Rosato, M. P., Paventi, G., Pizzuto, R., Gambacorta, M., Manchisi, A., & Passarella, S. (2010). The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents their in vitro liquid storage dependent damage. *Animal reproduction science*, *119*(1-2), 123-129.
- [42] Ocaña-Quero, J. M., Gomez-Villamandos, R., Moreno-Millan, M., & Santisteban-Valenzuela, J. M. (1997). Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *40*(3), 294-298.
- [43] Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, *25*(10), 2415-2426.
- [44] Zan-Bar, T., Bartoov, B., Segal, R., Yehuda, R., Lavi, R., Lubart, R., & Avtalion, R. R. (2005). Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility of mammalian and fish sperm. *Photomedicine and laser surgery*, *23*(6), 549-555.
- [45] Shahar, S., Wiser, A., Ickowicz, D., Lubart, R., Shulman, A., & Breitbart, H. (2011). Light-mediated activation reveals a key role for protein kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility. *Human reproduction*, *26*(9), 2274-2282.
- [46] Shahar, S., Hillman, P., Lubart, R., Ickowicz, D., & Breitbart, H. (2014). Activation of sperm EGFR by light irradiation is mediated by reactive oxygen species. *Photochemistry and photobiology*, *90*(5), 1077-1083.
- [47] Lubart, R., Lavi, R., Friedmann, H., & Rochkind, S. (2006). Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomedicine and Laser Therapy*, *24*(2), 179-185.
- [48] Yeste, M., Codony, F., Estrada, E., Lleónart, M., Balasch, S., Peña, A., ... & Rodríguez-Gil, J. E. (2016). Specific LED-based red light photo-stimulation

procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates. *Scientific reports*, 6, 22569.

- [49] Preece, D., Chow, K. W., Gomez-Godinez, V., Gustafson, K., Esener, S., Ravida, N., ... & Berns, M. W. (2017). Red light improves spermatozoa motility and does not induce oxidative DNA damage. *Scientific reports*, 7, 46480.
- [50] Abdel-Salam, Z., Dessouki, S. H. M., Abdel-Salam, S. A. M., Ibrahim, M. A. M., & Harith, M. A. (2011). Green laser irradiation effects on buffalo semen. *Theriogenology*, 75(6), 988-994.
- [51] Dreyer, T. R., Siqueira, A. F. P., Magrini, T. D., Nichi, M., Assumpção, M. E., Milazzotto, M. P., & Martinho, H. D. S. (2014). Low-level laser irradiation-induced changes in bovine spermatozoa. *arXiv preprint arXiv:1406.5234*.
- [52] Sierra-Valdez, F. J., Cisneros-Mejorado, A. J., Sánchez Herrera, D. P., & Ruiz-Suárez, J. C. (2012). A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation. *Review of Scientific Instruments*, 83(4), 044302.
- [53] Fraser, L. R. (1977). Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Experimental Zoology*, 202(3), 439-444.
- [54] Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W., & O'Brien, D. A. (2011). Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of reproduction*, 84(6), 1207-1215.
- [55] Yan, Y., WEI, C. L., ZHANG, W. R., CHENG, H. P., & Liu, J. (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 821-826.
- [56] Breitbart, H., Levinshal, T., Cohen, N., Friedmann, H., & Lubart, R. (1996). Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34(2-3), 117-121.
- [57] Kessel, D. (1982). Determinants of hematoporphyrin-catalyzed photosensitization. *Photochemistry and photobiology*, 36(1), 99-101.
- [58] Pottier, R., & Truscott, T. G. (1986). The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 50(3), 421-452.

- [59] Kim, C. S., & Jung, J. (1992). Iron-sulfur centers as endogenous blue light sensitizers in cells: a study with an artificial non-heme iron protein. *Photochemistry and photobiology*, *56*(1), 63-68.
- [60] Fraikin, G. Y., Strakhovskaya, M. G., & Rubin, A. B. (1996). The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *34*(2-3), 129-135.
- [61] Klebanov, G. I., Strashkevich, I. A., Chichuk, T. V., Modestova, T. M., & Vladimirov, Y. (1998). Effects of endogenous photosensitizers on the laser-induced priming of leucocytes. *Membrane & cell biology*, *12*(3), 339-354.
- [62] Edwards, A. M., & Silva, E. (2001). Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *63*(1-3), 126-131.
- [63] Losi, A., & Gärtner, W. (2011). Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: Flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochemistry and photobiology*, *87*(3), 491-510.
- [64] Lubart, R., Friedmann, H., Levinshal, T., Lavie, R., & Breitbart, H. (1992). Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *15*(4), 337-341.
- [65] Iaffaldano, N., Paventi, G., Pizzuto, R., Di Iorio, M., Bailey, J. L., Manchisi, A., & Passarella, S. (2016). Helium-neon laser irradiation of cryopreserved ram sperm enhances cytochrome c oxidase activity and ATP levels improving semen quality. *Theriogenology*, *86*(3), 778-784.
- [66] Breitbart, H., Levinshal, T., Cohen, N., Friedmann, H., & Lubart, R. (1996). Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *34*(2-3), 117-121.
- [67] Yeste, M., Codony, F., Estrada, E., Leonart, M., Balasch, S., Peña, A., ... & Rodríguez-Gil, J. E. (2016). Specific LED-based red light photo-stimulation procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates. *Scientific reports*, *6*, 22569.

- [68] Lavi, R., Shainberg, A., Shneyvays, V., Hochauser, E., Isaac, A., Zinman, T., ... & Lubart, R. (2010). Detailed analysis of reactive oxygen species induced by visible light in various cell types. *Lasers in surgery and medicine*, 42(6), 473-480.
- [69] Sato, H., Landthaler, M., Haina, D., & SCHILL, W. B. (1984). The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro. *Andrologia*, 16(1), 23-25.
- [70] Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2), 459-469.
- [71] Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., & Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of andrology*, 8(5), 338-348.
- [72] Halliwell B and Gutteridge JMC (1989) Free Radicals in Biology and Medicine (2nd edn) Clarendon Press, Oxford.
- [73] Nissen, H. P., & Kreysel, H. W. (1983). Superoxide dismutase in human semen. *Klinische Wochenschrift*, 61(1), 63-65.
- [74] Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval-Martin, D., & Calvayrac, R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete research*, 24(2), 185-196.
- [75] Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete research*, 23(1), 77-90.
- [76] DE LAMIRANDE, E. V. E., & GAGNON, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, 13(5), 379-386.
- [77] Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29(3), 548-555.
- [78] Lubart, R., Friedmann, H., Sinyakov, M., Cohen, N., & Breitbart, H. (1997). Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 21(5), 493-499.

- [79] Breitbart, H., Wehbie, R., & Lardy, H. A. (1990). Calcium transport in bovine sperm mitochondria: Effect of substrates and phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1026(1), 57-63.
- [80] Ierardi, V., Niccolini, A., Alderighi, M., Gazzano, A., Martelli, F., & Solaro, R. (2008). AFM characterization of rabbit spermatozoa. *Microscopy research and technique*, 71(7), 529-535.
- [81] Kumar, S., Chaudhury, K., Sen, P., & Guha, S. K. (2005). Atomic force microscopy: a powerful tool for high-resolution imaging of spermatozoa. *Journal of nanobiotechnology*, 3(1), 9.
- [82] Khanova, H. A., Markossian, K. A., Kurganov, B. I., Samoilov, A. M., Kleimenov, S. Y., Levitsky, D. I., ... & Ostrovsky, M. A. (2005). Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of  $\beta$ L-crystallin by  $\alpha$ -crystallin. *Biochemistry*, 44(47), 15480-15487.
- [83] Shinohara, H., Horiuchi, M., Sato, M., Kurisaki, J., Kusakabe, T., Koga, K., ... & Sugimoto, Y. (2007). Transition of ovalbumin to thermostable structure entails conformational changes involving the reactive center loop. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(1), 5-11.
- [84] Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., & Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of reproductive immunology*, 53(1-2), 133-150.
- [85] Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernández-González, E. O., Nishigaki, T., Treviño, C. L., ... & Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 131(6), 977-988.
- [86] Narisawa, S., Hecht, N. B., Goldberg, E., Boatright, K. M., Reed, J. C., & Millán, J. L. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Molecular and cellular biology*, 22(15), 5554-5562.
- [87] Suarez, S. S., Vincenti, L., & Ceglia, M. W. (1987). Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *Journal of Experimental Zoology*, 244(2), 331-336.

- [88] Ho, H. C., Granish, K. A., & Suarez, S. S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Developmental biology*, 250(1), 208-217.
- [89] White, D. R., & Aitken, R. J. (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete research*, 22(2), 163-177.
- [90] Brokaw, C. J. (1991). Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell motility and the cytoskeleton*, 18(2), 123-130.
- [91] Huang, Y.Y., Sharma, S.K., Carroll, J., Hamblin, M.R., 2011. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9, 602–618.

# Anexo A

## Publicaciones y Colaboraciones

- ❖ Ríos-Ramírez, M., Reyes-Figueroa, A. D., Ruiz-Suárez, J. C., & González-Gutiérrez, J. (2018). Pattern formation of stains from dried drops to identify spermatozoa motility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169,486-493.
- ❖ Carreón, Y. J., Ríos-Ramírez, M., Moctezuma, R. E., & González-Gutiérrez, J. (2018). Texture analysis of protein deposits produced by droplet evaporation. *Scientific reports*, 8(1), 9580.