



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS**  
**DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**UNIDAD MONTERREY**

**Efecto del óxido nítrico en la activación de canales CNG  
en espermatozoide de ratón**

**Tesis que presenta**

Rubén Martínez Solís

**para obtener el grado de Maestro en Ciencias en**

Ingeniería y Física Biomédicas

**Director de Tesis:**

Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2017



“¿Qué es la vida? Un frenesí. ¿Qué es la vida? Una ilusión,  
Una sombra, una ficción, y el mayor bien es pequeño:  
Que toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son.”

**Pedro Calderón de la Barca**



# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para mi desarrollo profesional y de este proyecto.

A mi asesor el Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera por aceptarme para trabajar bajo su dirección, por la disposición, consejos y apoyo brindados.

A mis sinodales el Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta y el Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González, así como a mis profesores, por ser guía y apoyo en mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio de Biofísica de Membranas: M. en C. Humberto Reyes, M. en C. Manuel Martínez, M. en C. Rocío Mercado y M. en C. Sandra Villarreal; por su ayuda, lecciones, tiempo y orientación.

A todo el personal académico y administrativo de Cinvestav Unidad Monterrey, porque por ellos es que esta se ha convertido en una institución de calidad.

A mi familia, por darme su amor, principios, valores y su apoyo para cumplir esta meta en mi vida y por seguirme impulsando en nuevos proyectos.

A mis amigos que son como mi familia: Humberto Reyes, Armando Olvera, Pedro Mota, Manuel Orta, Nancy Rosas, Myrthala Wong, Carol Vélez, Jorge Arias, Eduardo Jiménez, Denisse Fuentes, David Orozco, Manuel Martínez, Pamela Vázquez, Ivonne Martínez, Ana Gámez, Rocío Mercado, Eduardo Sosa, Claudia Zaragoza, Carlos Martell, María Candia, Karla Muñoz, Estefanía Zavariz, Mariana Rodríguez, Andrea Graham, Fernando Miranda, Pablo Acevedo, Mónica Lazcano, Sara Garibay, Ana Navarrete y Karla Meléndez, por sus consejos, su cariño, confianza y amistad; por darme los ánimos para no darme por vencido y enseñarme a disfrutar siempre de la vida.





# Índice

Índice.....	V
Índice de figuras.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	XI
Introducción.....	1
1.1 Importancia del calcio en la reproducción.....	2
1.2 Óxido Nítrico.....	3
1.2.1 Óxido Nítrico en sistemas biológicos.....	4
1.2.2 Óxido Nítrico en la reproducción.....	<del>45</del>
1.3 Membrana plasmática del espermatozoide.....	6
1.4 Canales de Ca <sup>2+</sup> en el espermatozoide.....	7
1.4.1 Canales de calcio voltaje dependientes.....	<del>89</del>
1.4.2 Canales receptores de potencial transitorio (Canales TRP).....	9
1.4.3 Canales liberadores de Ca <sup>2+</sup> de pozas intracelulares.....	10
1.4.4 Canales catiónicos del espermatozoide (Canales CatSper).....	<del>1044</del>
1.4.5 Canales activados por nucleótidos cíclicos (Canales CNG).....	11
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	15
3.1 Objetivo General.....	15
3.1.1 Objetivos específicos.....	15



Materiales y métodos.....	17
4.1 Reactivos y equipos .....	17
4.2 Estrategia experimental.....	17
4.3 Metodología .....	18
4.3.1 Obtención de los espermatozoides.....	18
4.3.2 Grupos experimentales .....	18
4.3.3 Preparación de los cubreobjetos y muestra.....	19
4.3.4 Preparación de los estímulos e inhibidores.....	20
4.3.5 Adquisición de videos y estimulación de espermatozoides.....	20
4.3.6 Análisis estadístico .....	21
 Resultados.....	 23
5.1 Evaluación de la respuesta a donador de óxido nítrico y activador de la guanilato ciclasa soluble.....	23
5.2 Efecto de inhibidores sobre la actividad de donador de óxido nítrico .....	25
5.3 Efecto del bloqueo de canales CNG sobre la respuesta al activador de la Guanilato ciclasa soluble.....	27
 Discusión .....	 <u>31</u> <del>30</del>
Conclusiones.....	<u>35</u> <del>34</del>
Perspectivas .....	<u>37</u> <del>36</del>
Referencias .....	<u>39</u> <del>38</del>

# Índice de figuras

Figura 1.1 Estructura de espermatozoide de ratón.....	1
Figura 1.2 Respuesta de hiperactivación y capacitación de espermatozoides con donadores de óxido nítrico.....	5
Figura 1.3 Cambios en la concentración de calcio relativa intracelular a donadores exógenos de óxido nítrico en espermatozoide.....	6
Figura. 4.1 Grupos experimentales.....	19
Figura 4.2 Micrografía en campo claro de espermatozoides de ratón y micrografía de fluorescencia de espermatozoides de ratón incubados con Fluo4/F127. ....	21
Tabla 4.3 Número de espermatozoides que respondieron al estímulo en cada grupo experimental. ....	22
Figura 5.1 Micrografía de fluorescencia de un espermatozoide de ratón cargado con Fluo-4 AM. ....	24
Figura 5.2 Registros representativos de la respuesta a estímulos de donador de óxido nítrico y activador de guanilato ciclasas solubles.. ....	24
Figura 5.3 Amplitud máxima de la respuesta al donador de óxido nítrico, Dietilamina NONOato (DNONO) y al activador de guanilato ciclasa soluble, YC1.....	25
Figura 5.4 Registros representativos de la respuesta de espermatozoides de ratón a inhibidores y donador de óxido nítrico.....	26
Figura 5.5 Amplitud máxima de la respuesta a inhibidores y donador de óxido nítrico.....	27
Figura 5.6 Registros representativos de la respuesta de espermatozoides de ratón a bloqueador de canales CNG y activador de guanilato ciclasas solubles.....	28
Figura 5.7 Amplitud máxima de la respuesta a bloqueador de canales CNG y activador de la guanilato ciclasa soluble.....	28
Figura 6.1 Vía de señalización del NO <sup>-</sup> en el espermatozoide de ratón basada en los resultados. ....	<u>3433</u>

# Abreviaturas

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Calcio Intracelular
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
Ca <sub>v</sub>	Canales de calcio voltaje dependientes
CNG	Canales activados por nucleótidos cíclicos
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNONO	Dietilamina NONOato
GCp	Guanilato ciclasa particulada
GCs	Guanilato ciclasas solubles
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
KCl	Cloruro de Potasio
L-cis-D	L-cis-Diltiazem
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
mM	MiliMolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NO <sup>·</sup>	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NS 2028	Inhibidor de guanilato ciclasa soluble
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PKG	Proteína cinasa dependiente de guanosina monofosfato cíclico
RA	Reacción acrosomal
WH	Medio Whitten-HEPES
YC-1	Activador de guanilato ciclasa soluble
ZP	Zona pelúcida
μl	Microlitros

# Resumen

La fecundación es el evento biológico más importante en los seres vivos de reproducción sexual, de su éxito depende la recombinación genética, la generación de un nuevo individuo y que las especies perduren. Para ello el espermatozoide debe viajar a través del tracto genital femenino y fusionarse con el óvulo. Para lograr esto, los espermatozoides deben experimentar diferentes cambios fisiológicos, incluyendo la hiperactivación de la motilidad, la capacitación y la reacción acrosomal. Todos estos cambios tienen en común el aumento de la concentración de calcio intracelular, y en estudios recientes se ha visto que el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ) juega un papel importante induciendo el aumento de este segundo mensajero. En otros sistemas biológicos, el óxido nítrico activa una vía de señalización específica, sin embargo, en el espermatozoide todavía se desconoce la cascada de señalización específica que activa este compuesto. A partir de esto, se propuso la hipótesis de que en el espermatozoide de ratón el  $\text{NO}^\cdot$  inicia una vía de señalización que incluye la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), que resulta en la conversión de GTP en cGMP, que a su vez activa los canales CNG, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el presente estudio, se analiza el efecto del  $\text{NO}^\cdot$  sobre el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el espermatozoide de ratón, utilizando un donador de óxido nítrico (DNONO), comparado con la respuesta a un activador de la GCs (YC-1) y utilizando un inhibidor de la GCs (NS 2028) y un bloqueador de los canales CNG (L-cis-D). Para ello se estimularon espermatozoides de ratón cargados con Fluo-4 AM, un fluoróforo sensible a los cambios en el calcio intracelular, con DNONO y se comparó la amplitud de su respuesta con los grupos experimentales preincubados con los inhibidores NS 2028 y L-cis-D. Estos resultados también se compararon con la respuesta ante la estimulación con YC-1 en ausencia o presencia de L-cis-D. A partir de nuestros resultados, podemos concluir que la GCs y los canales CNG participan en la vía de señalización activada por el  $\text{NO}$  que eleva la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides de ratón. Sin embargo, también concluimos que es posible sugerir la participación de otros mecanismos que eleven el  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides de ratón en el que el  $\text{NO}^\cdot$  y el GMPc estén involucrados.



# Abstract

Fertilization is the most important biological event in living beings of sexual reproduction, from its success depends the genetic recombination, the generation of a new individual and that the species survive. For this the sperm must travel through the female genital tract and fusion with the egg. To achieve this, the sperm must undergo different physiological changes, including the hyperactivation of motility, capacitation and acrosome reaction. All these changes have in common the increase in intracellular calcium concentration, and it has been seen from recent studies that nitric oxide (NO<sup>•</sup>) play an important role inducing the increase of this second messenger. In other biological systems, nitric oxide follows a specific signaling pathway, however, in the sperm is still unknown the specific signaling cascade that activates this compound. Based on this, it was proposed the hypothesis that in the mouse sperm, NO<sup>•</sup> triggers a signaling pathway that includes the activation of soluble guanylate cyclase (GCs), that results in the conversion of GTP into cGMP, which in turn activates CNG channels allowing the influx of Ca<sup>2+</sup>. In the present study, we analyses the effect of NO<sup>•</sup> on the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the mouse sperm using a nitric oxide donor (DNONO), compared with the response to a GCs activator (YC-1) and using a GCs inhibitor (NS 2028) and a CNG channels blocker (L-cis-D). To do this, mouse sperm loaded with Fluo-4 AM, a fluorophore sensitive to changes in intracellular calcium, were stimulated with DNONO and the amplitude of their response was compared with the experimental groups preincubated with the inhibitors NS 2028 and L-cis-D. These results were also compared with the response to a stimulation with YC-1 in absence or presence of L-cis-D. From our results, we can conclude that the GCs and CNG channels participate in the NO-activated signaling pathway that elevate the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in mouse sperm. However, we also conclude that it is possible to suggest the participation of other mechanism that lead to Ca<sup>2+</sup> elevation in mouse spermatozoa in which NO<sup>•</sup> and cGMP are involved.



# CAPÍTULO I

## Introducción

En los seres vivos con reproducción sexual, la fecundación es quizá el evento biológico más importante; para su éxito deben interactuar dos gametos: el óvulo y el espermatozoide [1]. En este proceso el espermatozoide debe viajar por el tracto genital femenino, encontrar un óvulo fértil y fusionar su membrana con este; el éxito de la interacción de estos gametos lograra la posibilidad de recombinación genética y que subsista la especie en el tiempo con la formación de un nuevo individuo [2].

El espermatozoide es una célula que posee una estructura y función altamente diferenciada, y es totipotente [3]. Para lograr la fecundación el espermatozoide cuenta con las siguientes características físicas: una cabeza (la mayor parte conformada por el núcleo; un centriolo y la vesícula acrosomal, para llevar a cabo la reacción acrosomal) y un flagelo (el cual provee la capacidad de nadar a través del tracto genital femenino). El número y localización de las mitocondrias (ubicadas en la parte media del espermatozoide) y la forma de la cabeza depende de la especie [1]. En la figura 1.1 se muestra un esquema de la anatomía del espermatozoide de ratón.

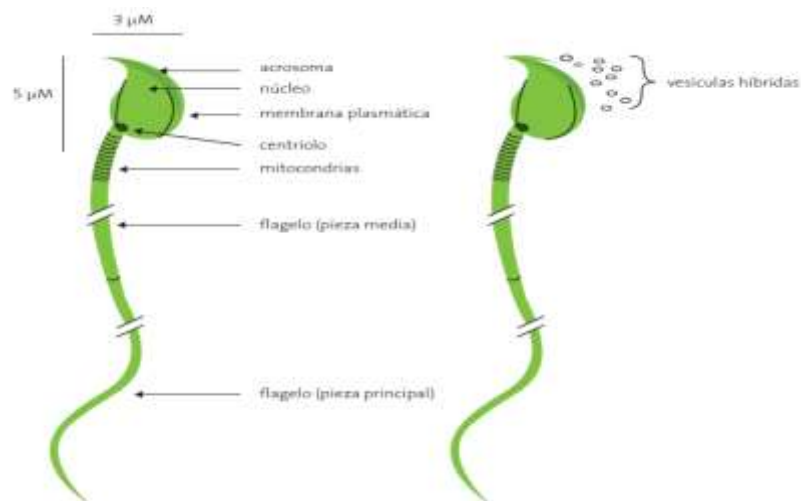


Figura 1.1 Estructura de espermatozoide de ratón. Ilustración del espermatozoide de ratón antes (izquierda) y después (derecha) de la reacción acrosomal. Imagen tomada de [1]



Además de las características físicas del gameto masculino, en los mamíferos, el espermatozoide debe pasar por el proceso conocido como capacitación para desarrollar la habilidad de fecundar el óvulo; definido como un proceso donde los espermatozoides con acrosoma intacto adquieren la habilidad de desencadenar la reacción acrosomal (RA) que es necesaria para la liberación de enzimas que degradan la matriz extracelular del óvulo (zona pelúcida) permitiendo el contacto y con ello la fusión de membranas de ambos gametos [4].

En la capacitación el espermatozoide lleva cabo una serie de cambios fisiológicos como el cambio de pH, hiperpolarización, fosforilación, el aumento en la producción de segundos mensajeros como Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) y Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) y el aumento en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) [2] [5]. En el caso de roedores, los espermatozoides al pasar del útero a las trompas de Falopio se hiperactivan, donde se altera el batido de flagelo debido a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales iónicos en el flagelo, resultando en un cambio de motilidad que le permite alcanzar al óvulo [6].

En los mamíferos es en el tracto genital femenino donde ocurre de manera *in vivo* el proceso de capacitación, el sitio donde comience el proceso de capacitación dependerá de donde sean depositados los espermatozoides [7]; pero este proceso puede reproducirse *in vitro* en un medio que sustituya los elementos del fluido uterino en el cual se incuban los espermatozoides [8], el tiempo de incubación dependerá de la especie, en ratones será entre 90 y 120 minutos y en humanos entre 3 y 5 horas [9].

## 1.1 Importancia del calcio en la reproducción

El calcio es un metal suave que se encuentra en seres vivos en el medio intracelular como ion  $Ca^{2+}$ , unido a otras moléculas o precipitado en el esqueleto óseo; dependiendo de la especie será variable el porcentaje del mismo. El  $Ca^{2+}$  tiene un papel como cofactor de varias reacciones enzimáticas, procesos metabólicos y otras funciones biológicas [10].

El calcio es un mediador en el espacio intracelular, convirtiéndose en un segundo mensajero y el más utilizado en la señalización celular. Actúa en la regulación de funciones como secreción, transcripción genética, actividad enzimática, contracción muscular, fosforilación de proteínas y en procesos de muerte celular [11].

El calcio se convertido en el principal mensajero en diversas funciones de los seres vivos, esto asociado principalmente a la necesidad de un mensajero que se una fuerte y específicamente a las proteínas. El  $\text{Ca}^{2+}$  mantiene una unión estrecha con las proteínas aunado a su densidad de carga, su radio iónico y la unión reversible, este mensajero intracelular se ha convertido evolutivamente en el más versátil, de la amplia gama de aniones y cationes [12].

En la reproducción sexual el calcio se ha convertido en un segundo mensajero importante dentro de los cambios del espermatozoide, ya que es el responsable de la motilidad y RA. Por ello el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  está muy bien regulado en el espermatozoide; lo cual se logra a través de la activación de diversos canales iónicos presentes en la membrana del mismo, de los cuales se ha caracterizado ampliamente el mecanismo de acción de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y canales CatSper, localizados principalmente en el flagelo el espermatozoide [13]. Sobre los canales iónicos presentes en el espermatozoide de mamífero se ahondará más adelante.

## 1.2 Óxido Nítrico

El óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ) está presente en mamíferos en pequeñas cantidades, es un gas incoloro y poco soluble en agua, además de ser altamente inestable en el aire por su rápida oxidación por lo que se le considera un radical libre [14]. Los estudios relacionados con nitratos en las funciones fisiológicas en mamíferos son de reciente interés, pero se ha evidenciado que las células de mamíferos poseen la capacidad de sintetizar nitritos aun en ausencia de procesos patológicos [15].

El  $\text{NO}^-$  es sintetizado in vivo al convertir L-arginina en L-citrulina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), enzima encontrada en diversos tipos celulares como las células de cerebro, endoteliales, macrófagos, estomago, glándulas adrenales y en el tracto genital masculino y femenino [15] [17].

Algunos efectos a bajas concentraciones del  $\text{NO}^-$  abarcan la relajación muscular, la inhibición de la adhesión y agregación de plaquetas y neurotransmisión [16]; pero en concentraciones altas de  $\text{NO}^-$  o sus productos pueden tener efectos adversos sobre las funciones celulares como apoptosis, produce nitración irreversible de proteínas, inactivación enzimática, daño del DNA [18].

### **1.2.1 Óxido Nítrico en sistemas biológicos**

En los últimos años se ha estudiado sobre los mecanismos de acción del  $\text{NO}^-$ , en células de músculo liso vascular se ha visto que el  $\text{NO}^-$  producido por las células endoteliales, activa la guanilato ciclasa soluble (GCs). En este caso los estímulos físicos y químicos activan la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) de las células endoteliales, sintetizando  $\text{NO}$  a partir de L-arginina y oxígeno y por reducción de nitrato orgánico, con una semivida en sangre de solo 6 segundos. El  $\text{NO}$  activa la GCs, enzima encargada de convertir el trifosfato de guanosina (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (GMPc), esta molécula a su vez es capaz de activar la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), que participa en diversas funciones como la relajación de los vasos sanguíneos [19].

El  $\text{NO}^-$  también actúa como un neurotransmisor y como una hormona en el sistema nervioso, sus funciones neuronales están principalmente en la transmisión nerviosa periférica no adrenérgica en tejidos secretores y contráctiles, procesamientos de entradas sensoriales, aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica; además se sabe que interviene también en procesos patológicos como la epilepsia, migraña, choque séptico y algunas enfermedades neurodegenerativas [20].

En lo que respecta al sistema inmune, el modelo más estudiado es la respuesta de los macrófagos; en estas células la síntesis de  $\text{NO}^-$  produce efectos citotóxicos específicos contra los microorganismos patógenos de manera independiente del proceso de fagocitosis [21]. Adicionalmente dentro del sistema inmune, otro tipo de células estudiadas son los neutrófilos que han demostrado participar en la respuesta inflamatoria, liberando  $\text{NO}^-$  ante la estimulación con quimioatrayentes, pero no han demostrado una función citotóxica [20].

### **1.2.2 Óxido Nítrico en la reproducción**

En el proceso de reproducción se ha demostrado que el óxido nítrico participa a diferentes niveles en el sistema reproductor. A nivel hipofisario estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH) y en el tracto genital femenino el  $\text{NO}^-$  modula la motilidad y contracción del útero facilitando el paso de los espermatozoides [22] [23] [24]. En el macho el  $\text{NO}^-$  induce la erección del pene y la NOS ha sido identificada en diferentes órganos del sistema genital [25] [26], a nivel celular en el espermatozoide participa en la hiperactivación del espermatozoide, en el

proceso de capacitación y en llevar a cabo la reacción acrosomal (todos estos eventos en el espermatozoide están relacionados con el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ ) [27]. Se ha reportado que el adicionar donadores de óxido nítrico en espermatozoides aumenta la hiperactivación de los mismos y aumenta el número de espermatozoides capacitados [16].

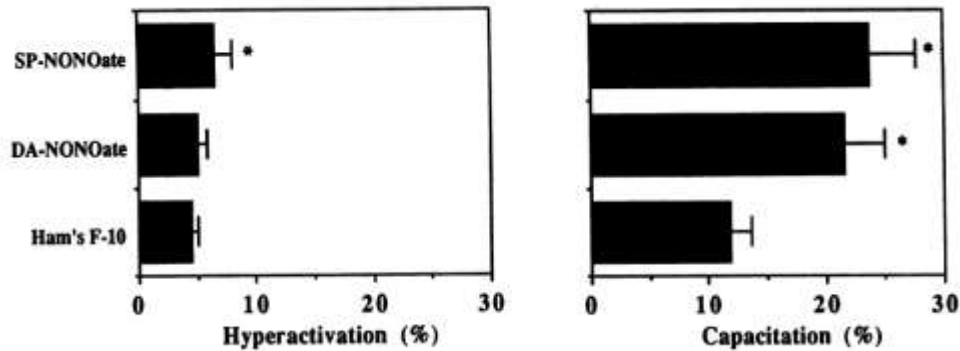


Figura 1.2 Respuesta de hiperactivación y capacitación de espermatozoides con donadores de óxido nítrico. En la gráfica de la izquierda se muestra que se incrementa el porcentaje de espermatozoides hiperactivados cuando son incubados con la Espermina-NONOato (SP-NONOate), y en la imagen de la derecha que el porcentaje de espermatozoides capacitados aumenta con ambos donadores de óxido nítrico, Dietilamina-NONOato (DA-NONOate) y SP-NONOato. Tomado de [16]

Como se observa en la figura 1.2, el donador de  $NO^-$ , Espermina-NONOato (SP-NONOate) produce un incremento en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados (se estudiaron los movimientos del flagelo del espermatozoide y se veía que estos fueran de mayor fuerza y rapidez) y capacitados; mientras que el donador Dietilamina-NONOato (DA-NONOate) solo produce un incremento en el proceso de capacitación, para ver el porcentaje de espermatozoides capacitados se observó in vitro la capacidad de los espermatozoides de fecundar un óvulo. [28]

El óxido nítrico (NO) ha demostrado ser importante en la función del esperma y su concentración parece determinar dichos efectos; diversos estudios han demostrado estos efectos en el espermatozoide sin embargo no han sido capaces de proporcionar el mecanismo por el cual esto sucede. [9]

En experimentos preliminares de nuestro equipo de trabajo, en el laboratorio de biofísica de membranas, se ha observado el efecto del  $NO^-$  en la concentración relativa de calcio intracelular por medio de experimentos de microfluorimetría, probando dos donadores de óxido nítrico (Espermina-NONOato y Dietilamina-NONOato) como se observa en la figura 1.3, al tener el

espermatozoide en su estado basal y aplicar el estímulo se observa un aumento de la concentración de calcio tanto en cabeza como flagelo para ambos donadores a una concentración de 300  $\mu\text{M}$ .

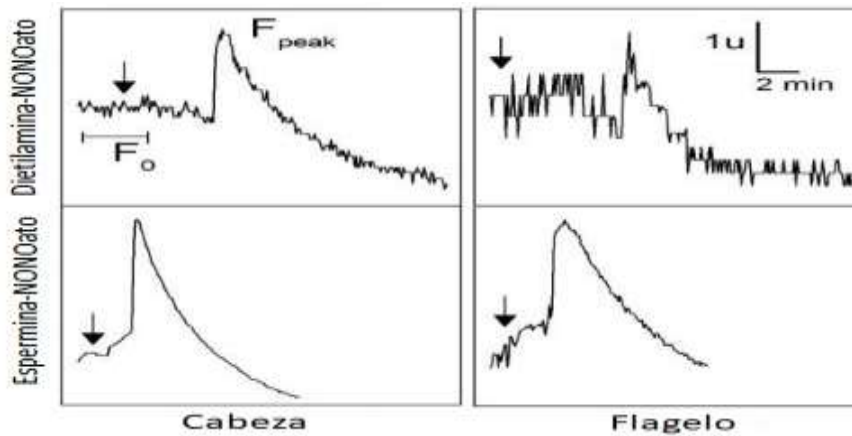


Figura 1.3 Cambios en la concentración de calcio relativa intracelular a donadores exógenos de óxido nítrico en espermatozoide. En la parte superior se observa el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  para Dietilamina-NONOato para cabeza (izquierda) y flagelo (derecha). En la parte inferior se observa el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  para Espermina-NONOato para cabeza (izquierda) y flagelo (derecha); ambos donadores a una concentración de 300  $\mu\text{M}$ .

### 1.3 Membrana plasmática del espermatozoide

Una característica de todas las células es la de poseer una membrana plasmática, que cumple con las funciones de delimitar toda la célula, mantener el equilibrio entre el espacio extracelular e intracelular, comunicación de la célula y las respuestas específicas a señales extracelulares. Es una bicapa compuesta por fosfolípidos, colesterol, proteínas y glucoproteínas. [29]

En el espermatozoide esta membrana plasmática es heterogénea, se encuentra muy bien determinada y subdividida en regiones que se definen en el proceso de espermatogénesis, esto por poseer diferente composición para llevar a cabo funciones específicas según la región del espermatozoide. Estas regiones en la cabeza del gameto son el acrosoma anterior, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal; y en el flagelo la pieza media y la región posterior del flagelo [3]

La composición de lípidos y proteínas de cada región de la membrana es diferente acorde a las funciones específicas a desempeñar por cada una de ellas, la mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos (que ayudan a la fluidez de la membrana) y colesterol (que actúa como

estabilizador de la membrana y varía su concentración según la región, siendo más alta en la región acrosomal) [30].

Las proteínas de la membrana plasmática se clasifican en proteínas integrales (o estructurales) y proteínas periféricas. Las proteínas integrales se encuentran embebidas en la membrana y pueden actuar como receptores o como canales o poros que permiten el intercambio de moléculas e iones entre el espacio intracelular y extracelular; las proteínas periféricas funcionan como receptores de la superficie o como transductores de vías de señalización [31] [32].

Para que el proceso de fecundación sea exitoso debe existir una comunicación entre los gametos e influir uno en el otro, esto en parte se logra por medio de la regulación del transporte de iones que atraviesan la membrana y es clave en la interacción de estos. Todas las células poseen canales iónicos; el espermatozoide no es la excepción y su regulación influye sobre cómo se desplaza el espermatozoide y sobre los cambios necesarios que lo preparan para llevar a cabo la RA [1].

## **1.4 Canales de $\text{Ca}^{2+}$ en el espermatozoide**

Se ha mencionado la importancia del calcio como segundo mensajero dentro de múltiples funciones biológicas, en el caso de la fecundación, se ha visto que este ion es el responsable de aumentar la motilidad (hiperactivación), ser necesario para la capacitación y desencadenar la RA. La regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular el espermatozoide depende del calcio presente en el medio extracelular y por lo tanto necesita de los canales iónicos.

Estos complejos proteicos, llamados canales iónicos se encuentran embebidos en la membrana plasmática y en la membrana de organelos, tienen una alta especificidad y capacidad para regular la homeostasis celular de  $\text{Ca}^{2+}$ . En reposo la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en el citoplasma es de alrededor de 100 nM, concentración que, en comparación con la encontrada en el medio extracelular (~1.8 mM) o con la que se encuentra en pozas intracelulares, es inferior por hasta tres órdenes de magnitud. Con lo cual es entendible que estos canales han evolucionado con características únicas y temporales para adaptarse a las funciones específicas de cada célula. [33]

La baja  $[Ca^{2+}]$  libre en el citoplasma se ha asociado a la necesidad de las células por utilizar compuestos con fosfatos como energía metabólica, altas  $[Ca^{2+}]$  no serían compatibles para llevar a cabo esta conversión de energía, además de esto el gradiente de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular al interior de la célula se utiliza como una fuerza motriz directa para los eventos de señalización; con estas características es posible para los canales regular la concentración de  $Ca^{2+}$  [34].

Para mantener la  $[Ca^{2+}]$  en el orden de nM en el estado en reposo, la célula utiliza energía, a partir de compuestos de fosfatos, como ATP que activa el transporte activo a través de proteínas conocidas como bombas para liberar  $Ca^{2+}$  al medio extracelular, o lo captura hacia el interior del retículo endoplásmico por medio de bombas que secuestran el calcio citosólico; estas adaptaciones evolutivas son las que han permitido a las células poder regresar la concentración de calcio a su estado basal de manera eficaz y sin implicar un estrés celular ante la necesidad de los aumentos abruptos de calcio en el citosol durante las respuesta celulares a diversos estímulos [34].

Todas las células cuentan con gradientes de iones entre el medio extracelular e intracelular, y de canales iónicos preparados para responder a señales externas o internas que permiten el flujo de estos iones; dichos canales iónicos pueden ser regulados por voltaje (cambios en el potencial de membrana de la célula), presión, agotamiento de depósitos internos de calcio y/o por ligandos. Cada una de estas vías de regulación posee un conjunto de moléculas de señalización específico y adaptado según la función que deba de desarrollar. [35].

El espermatozoide cuenta con diferentes canales iónicos responsables del flujo de  $Ca^{2+}$ , como los canales de calcio voltaje dependientes, canales TRP, canales liberadores de  $Ca^{2+}$ , canales CatSper, canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG), receptores de rianodina y receptores  $IP_3$ , que participan en los diferentes procesos fisiológicos y se encuentran tanto en el organelos en el interior de la célula como en la membrana plasmática [36].

### **1.4.1 Canales de calcio voltaje dependientes**

La función principal de los canales de calcio voltaje dependientes ( $Ca_v$ ) o sensibles a voltaje es la de convertir cambios en el potencial de membrana en una señal de  $Ca^{2+}$ . Los canales  $Ca_v$  están divididos en dos tipos diferentes según su funcionalidad: los canales de alta tensión (HVA) y canales de baja tensión (LVA) [37]

Los  $Ca_v$  están formados básicamente por una subunidad  $\alpha_1$ , la cual forma el poro de transporte a través de la membrana y contiene el sensor del cambio de potencial; cada subunidad se conforma por cuatro dominios iguales (I-IV), cada uno de ellos con seis hélices transmembranales (S1-S6) [38] [36]

La apertura de los canales HVA ocurre después de despolarizaciones de alta intensidad o fuertes, se clasifican en canales tipo L, N, P/Q, y R según sus características farmacológicas y biofísicas de la corriente, y son codificados por siete genes de las subfamilias  $\alpha_1$ ,  $Ca_v$  1.1 a 1.4 y  $Ca_v$  2.2 a 2.3 [37]. Por otro lado, la apertura de los canales LVA ocurre en respuesta a despolarizaciones de baja intensidad o débiles, a diferencia de los canales HVA solo expresan canales tipo T y se codifican por genes de la subfamilia  $\alpha_1$ ,  $Ca_v$ 3.1 a  $Ca_v$  3.3. [39]

En el espermatozoide se ha documentado la presencia de canales LVA y se sugiere que las corrientes se producen a partir de las subunidades  $Ca_v$ 3 [40]. La función de estos canales en el gameto aún no está definida, sin embargo, por su distribución subcelular y propiedades biofísicas se sugiere que son funcionales particularmente en la RA [1] [41].

## **1.4.2 Canales receptores de potencial transitorio (Canales TRP)**

Los canales receptores de potencial transitorio (TRP) abarcan una superfamilia de canales catiónicos que han demostrado diversas funciones y comprende 30 genes diferentes. [62]. Estos canales se han clasificado en siete grupos acorde a sus similitudes debido a que sus funciones son amplias y en algunos casos desconocidas: TRPC (canónica), TRPV (vaniloides), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (anquirina) y TRPN (aun no identificados en mamíferos) [42].

Los canales TRP están compuestos por un homotetrámero o heterotetrámero de subunidades  $\alpha$ , cada una compuesta de seis segmentos transmembranales (S1-S6) con un dominio de poro entre los dominios S5 y S6, y sus terminales amino y carboxilo se sitúan en el espacio intracelular. Su estructura es similar a las de los canales activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG) y canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, sin embargo, son solo débilmente dependientes del voltaje por no poseer una secuencia de residuos positivos en el dominio S4 [43].



El mecanismo de activación de los canales TRP es multimodal ya que pueden ser activados por diferentes clases de estímulos, como cambios en la temperatura, esfuerzos mecánicos, cambios en la acidez o por ligandos [44]. En el espermatozoide de ratón y humano se han identificado canales TRPC 1, 2, 3 y 6 localizados principalmente en el flagelo y TRPC 2 en la región acrosomal, lo que sugiere que pueden estar participando en la regulación de la motilidad del espermatozoide y en la RA [45]. Además, se ha evidenciado que en *Caenorhabditis elegans*, que carecen del gen TRPC 3 son infértiles debido a que sus espermatozoides no poseen la capacidad de fusionarse con el ovulo a pesar de tener motilidad [46].

### **1.4.3 Canales liberadores de $\text{Ca}^{2+}$ de pozas intracelulares.**

Existen dos clases principales de canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares, los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), en ambos el canal funcional es un complejo tetramérico y existen tres tipos de genes diferentes que codifican cada receptor. Los mensajeros intracelulares ADRPc, NAADP,  $\text{IP}_3$  y el mismo  $\text{Ca}^{2+}$  modulan la apertura de estos canales [47].

Los canales  $\text{IP}_3\text{R}$  se han observado en todas las etapas de la espermatogénesis y se localizan en la membrana acrosomal en espermatozoides maduros de mamíferos, con lo que se les ha asociado con la regulación de la RA, así como en la hiperactivación [48] [49].

### **1.4.4 Canales catiónicos del espermatozoide (Canales CatSper)**

Recientemente se ha identificado una nueva clase de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , llamados canales catiónicos del espermatozoide (canales CatSper). Existen cuatro miembros en la familia de estos canales que se han visto expresados en los testículos de mamíferos, CatSper 1 a 4, pero en el espermatozoide solo se han identificado dos subfamilias, los CatSper1 y CatSper 2, que son necesarios para la fertilidad masculina y regulación de la motilidad de los espermatozoides [50] [51].

Las cuatro subfamilias de los canales CatSper comparten una estructura similar de seis segmentos transmembranales, su dominio S4 es similar en secuencia al dominio de detección de voltaje de otros canales iónicos dependientes de voltaje y los dominios S5-S6 tienen una gran similitud con el dominio que forma el poro en los canales  $\text{Ca}_v$ , la similitud con estos canales ha

llevado a proponer que los canales de CatSper se combinan para formar homotratameros o heterotetrameros. [51]

Se ha demostrado que en ratones *knockout* a canales CatSper1 y CatSper2 son infértiles. Por otro lado, se ha observado que el comportamiento de apareamiento, la espermatogénesis, morfología del gameto y la motilidad no se ven alteradas, sin embargo, los espermatozoides no hacen la transición al estado de hiperactivación lo que les impide llevar a cabo la RA. [52]

### **1.4.5 Canales activados por nucleótidos cíclicos (Canales CNG)**

Los canales activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG) son canales catiónicos poco selectivos que fueron identificados por primera vez en células fotorreceptoras de la retina y en neuronas sensoriales del bulbo olfatorio [53] [54]. La estructura de los canales CNG es 4 subunidades cada una de ellas compuesta de seis segmentos transmembranales, un dominio de poro entre los segmentos 5-6 que se abre al unir AMPc o GMPc en el sitio de unión a nucleótidos cíclicos que está localizado en el extremo carboxilo terminal en el lado intracelular [53] [55].

En mamíferos se han identificado seis diferentes genes que codifican para estos canales, CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4, CNGB1 y CNGB3. Se ha demostrado que las subunidades A pueden formar canales funcionales en homotetrameros, sin embargo, en tejidos nativos se ha visto que estos canales se agrupan en heterotetrámeros de subunidades A y B lo que se traduce en una mayor variedad de canales funcionales, pudiéndose mostrar una mayor especificidad ante diversos estímulos [56].

En general en todos los canales CNG nativos, el GMPc es el ligando más potente que el AMPc, sin embargo, los canales CNG en neuronas sensoriales olfatorias este último es el ligando fisiológico; con lo anterior se demuestra que los canales CNG son tan específicos y pueden responder a diferentes estímulos por la diversidad en los complejos heterotetramericos que los pueden conformar [57].

En testículos de mamíferos se expresan las subunidades CNGA3, CNGB1 y CNGB3 [58], y estudios con inmunocitoquímica en espermatozoides de mamíferos han revelado que la subunidad CNGA1 se distribuye a lo largo de todo el flagelo mientras que CNGB1 se localiza en la pieza principal [59]. Adicionalmente resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, se

observó que las subunidades CNGA1 a 4 también se expresan en la base de la cabeza y en la zona periacrosomal en espermatozoides de ratón.

Fisiológicamente los canales CNG inducen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de ratón y demuestra ser más sensibles a GMPc que a AMPc [60]. El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por nucleótidos cíclicos se han atribuido a estos canales CNG, sin embargo, estudios con espermatozoides *knockout* para CatSper 1 en los que el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por nucleótidos cíclicos se pierde, han planteado controversia del papel funcional de los canales CNG, a pesar de que los canales CatSper no poseen un sitio específico de unión a nucleótidos cíclicos [61].

# CAPÍTULO II

## Hipótesis

En el espermatozoide ocurren diferentes cambios fisiológicos necesarios para que se lleve al cabo con éxito la fecundación del óvulo, tales como el proceso de capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosomal; así mismo se ha reportado que el óxido nítrico puede influir en estos procesos fisiológicos del espermatozoide, sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares por lo que esto sucede. En diversos sistemas biológicos se conoce que la vía de señalización que sigue el óxido nítrico para llevar a cabo sus funciones involucra la acción de la guanilato ciclasa soluble y de segundos mensajeros como el GMPc y AMPc.

Es de especial interés el entender cómo se regula la  $[Ca^{2+}]_i$ , ya que es un factor que tienen en común estos procesos fisiológicos en el espermatozoide de mamífero; aunado a esto se ha demostrado que el espermatozoide posee canales de  $Ca^{2+}$  regulados por nucleótidos cíclicos, y las vías de señalización y los segundos mensajeros generados por la acción del óxido nítrico podrían desencadenar la apertura de estos canales iónicos.

Debido a ello, nos hemos planteado la hipótesis de que el óxido nítrico aumenta el calcio intracelular en el espermatozoide de ratón a través de una vía de señalización que involucra al GMPc y la activación de canales CNG.



# CAPÍTULO III

## **Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Con el fin de corroborar la hipótesis propuesta en este proyecto, se plantea el objetivo general de:

- Determinar la participación del óxido nítrico en la activación de los canales CNG del espermatozoide de ratón.

#### **3.1.1 Objetivos específicos**

Para cumplir con el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Identificar el papel de la guanilato ciclasa soluble en el aumento de la concentración de calcio intracelular.
- Determinar la participación de los canales CNG en el aumento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a óxido nítrico.



# CAPÍTULO IV

## **Materiales y métodos**

### **4.1 Reactivos y equipos**

Todos los reactivos utilizados para la preparación del medio Whitten-HEPES (WH) así como el donador de óxido nítrico (Diethylamine NONOate sodium salt) y el activador e inhibidor de GCs (YC-1 y NS 2028), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El L-cis-Diltiazem (L-cis-D) fue adquirido de abcam Biochemicals y el fluoróforo sensible a Calcio (Fluo-4AM) de Invitrogen. Los ratones de la cepa CD-1 fueron proporcionados por el Cinvestav Unidad Zacatenco y fueron manipulados bajo un protocolo aprobado por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales del Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav.

La adquisición de videos se hizo mediante una cámara Nikon DS Qi1Mc conectada a un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo 40x/0.60, iluminado con una lámpara de Hg de 120 W, se utilizó una longitud de onda de excitación de  $\lambda_{ex} = 480 \pm 40$  nm y de emisión de  $\lambda_{em} = 535 \pm 25$  nm.

### **4.2 Estrategia experimental**

Se ha mencionado que el espermatozoide cuenta en su membrana plasmática con diferentes complejos proteicos (canales iónicos) que poseen la capacidad de transportar iones entre el medio extracelular e intracelular, siendo uno de los más importantes para la fecundación el flujo de calcio.

Para observar los intercambios iónicos entre el interior y exterior de las células se han desarrollado fluorófos, compuestos derivados de quelantes iónicos con la característica química de asociarse a iones específicos; un grupo funcional de estos compuestos absorben energía a una longitud de onda específica (son excitados) y la emitirá en una mayor longitud de onda. La energía emitida dependerá por las propiedades específicas del fluoróforo.



Para medir los cambios de la  $[Ca^{2+}]_i$  en este proyecto se utilizó el fluoróforo Fluo-4, compuesto quelante de  $Ca^{2+}$ , que al unir este ion, incrementa la intensidad de fluorescencia emitida. Se utiliza la molécula de Fluo-4 es su variante esterificada con acetoximetil no fluorescente (Fluo-4 AM) que le permite atravesar con facilidad la membrana plasmática, una vez que se encuentra en el citoplasma, el enlace éster es degradado por las esterasas del espermatozoide, impidiéndose su salida de la célula y quedando el Fluo-4 en su forma activa.

Utilizamos el Fluo-4 AM para medir los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta ante dos estímulos: un donador de  $NO^-$  y un activador de la GCs. La respuesta a estos estímulos se comparó con la respuesta observada en espermatozoides preincubados previamente al estímulo con un inhibidor de la GCs o con un bloqueador de los canales CNG.

## **4.3 Metodología**

### **4.3.1 Obtención de los espermatozoides**

Los espermatozoides fueron obtenidos de ratones machos de la cepa CD-1 de entre 8 y 15 semanas de edad, para asegurar la maduración de las células. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se diseccionó y extrajo la región caudal de ambos epidídimos, los cuales se cortaron y trituraron manualmente en 1.5 ml de medio WH ajustado a pH 7.3 el cual contenía los siguientes reactivos a estas concentraciones: NaCl a 135 mM, KCl a 5 mM,  $CaCl_2$  a 2 mM,  $MgSO_4$  a 1 mM, Glucosa a 10 mM, Piruvato a 1 mM y HEPES-Na a 10 mM; este medio corresponde a una solución fisiológica que simula las características del tracto genital femenino, sin capacitar los espermatozoides. Después de 25 minutos de incubación en el medio WH, se recupera el sobrenadante que contiene los espermatozoides en suspensión (viables) para evitar residuos del tejido en la muestra.

### **4.3.2 Grupos experimentales**

Para el cumplimiento de los objetivos del presente proyecto todos los grupos fueron incubados en medio no capacitante, esto debido al antecedente de que en el espermatozoide el óxido nítrico contribuye en los cambios fisiológicos previos a su capacitación.

Los grupos fueron comparados entre los espermatozoides a los que se les ha aplicado un estímulo y los espermatozoides a los que se les aplicó un estímulo posterior de haberse preincubado con algún inhibidor como se muestra en la figura 4.1.

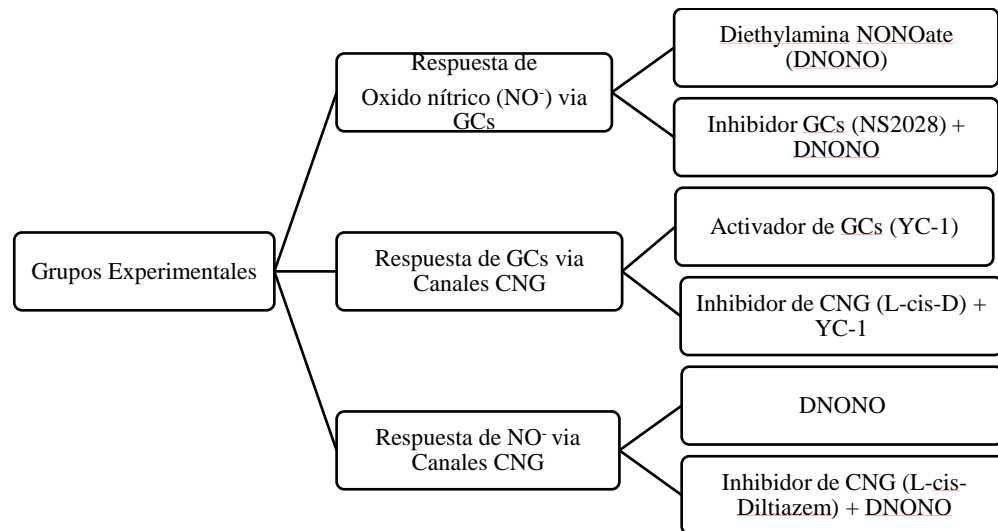


Figura. 4.1 Grupos experimentales. Con el propósito de describir la vía de señalización del óxido nítrico se subdividió en 3 grupos experimentales.

Se preparó una solución stock de Fluo-4 AM con Dimetil Sulfoxido (DMSO) a 2 mM, la cual se diluyo en medio WH y Plurónico F127 al 20% (este detergente facilita la difusión del fluoróforo a través de la membrana plasmática) para obtener una solución de Fluo4/F127.

De la suspensión de espermatozoides se tomaron 99  $\mu$ l a los que se les adicionó 1  $\mu$ l de la solución Fluo4/F127 para tener una concentración final de 10  $\mu$ M de Fluo-4 AM y de 0.06% de Plurónico F127 en 100  $\mu$ l. Los espermatozoides se incubaron a 37° C por 60 minutos, para cargar el Fluo-4 AM, en condiciones de oscuridad y en una atmosfera con O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%.

### 4.3.3 Preparación de los cubreobjetos y muestra

Previo a la incubación de los espermatozoides; se prepararon los cubreobjetos con poli-L-lisina, este polímero permite que las células de adhieran al vidrio. Para esto los cubreobjetos se sumergieron en una solución de poli-L-lisina al 0.05% por 2 horas a temperatura ambiente; después de este tiempo se dejaron secar y se adaptaron en una cámara de registro con una capacidad de 800  $\mu$ l.

Los espermatozoides incubados y cargados con Fluo-4 AM se colocaron en la cámara de registro; se dejaron por 20 minutos para permitir que se adhieran las células, protegidos de la luz. Utilizando un sistema de perfusión se realizó un lavado de la cámara con 5 ml de medio WH para eliminar residuos de la solución Fluo4/F127 no cargada y remover los espermatozoides no adheridos.

#### **4.3.4 Preparación de los estímulos e inhibidores**

Para evaluar la participación del óxido nítrico en la activación de los canales CNG y teniendo nuestra hipótesis de que se sigue la ruta de  $\text{NO}^- \rightarrow \text{GCs} \rightarrow \text{Canales CNG}$  se utilizaron dos estímulos y dos inhibidores para describir la vía que sigue el óxido nítrico.

Los dos estímulos fueron un donador de óxido nítrico, Dietilamina NONOato (DNONO) y un activador de la Guanilato ciclasa soluble (YC-1), que es independiente de  $\text{NO}^-$ . Se emplearon dos inhibidores, un inhibidor de GCs (NS 2028) y un bloqueador de canales CNG (L-cis-Diltiazem)

El DNONO se diluyó en una solución salina amortiguadora por fosfatos (PBS) a una concentración de 60 mM; el YC-1 y el NS 2028 fueron diluidos en DMSO a concentración 20 mM y 37.1 mM respectivamente; y el L-cis-D se diluyó en agua destilada a concentración de 10 mM. Todos los stocks fueron alicutados en bolos para los diferentes experimentos. Las concentraciones finales utilizadas para los experimentos fueron: DNONO a 300  $\mu\text{M}$ , YC-1 a 100  $\mu\text{M}$ , NS 2028 a 10  $\mu\text{M}$  y L-cis-D a 100  $\mu\text{M}$ .

#### **4.3.5 Adquisición de videos y estimulación de espermatozoides**

En un microscopio invertido de fluorescencia se montó la cámara de registro con los espermatozoides; se seleccionó una zona de interés donde los espermatozoides puedan verse completos. Previo a la captura de los videos, se le adiciono a los espermatozoides un vehículo o el inhibidor según fuera el grupo experimental y se dejaron por 2 minutos en oscuridad. Posterior a los dos minutos se observó la dinámica de la intensidad de fluorescencia, registrándose en videos de 3 minutos, tiempo durante el cual se adiciono un bolo de DNONO o YC-1 a los 15 segundos de iniciada la adquisición del video, dependiendo del grupo experimental.

Con el software NIS-Elements AR v3.0 (Nikon Instruments) se adquirieron los videos y se analizaron los cambios de fluorescencia en la cabeza de los gametos. Se obtuvieron los datos dibujando un área de interés sobre la cabeza de los espermatozoides y otra área en un lugar

circundante cercano a la célula, la cual sirvió para determinar la iluminación y el ruido del sistema, los valores de esta última se suprimieron de los datos del área de la cabeza. La dinámica de la concentración de calcio intracelular relativa se registra como  $\Delta F/F_0$ , donde  $\Delta F = F_{\max} - F_0$ ;  $F_{\max}$  es el pico máximo de fluorescencia detectado después de añadir un estímulo,  $F_0$  es la fluorescencia basal antes de añadir el estímulo (promedio de muestras antes del estímulo). En la figura 4.1 se muestra la micrografía de los espermatozoides en campo claro y de fluorescencia después de incubación con Fluo4/F127.

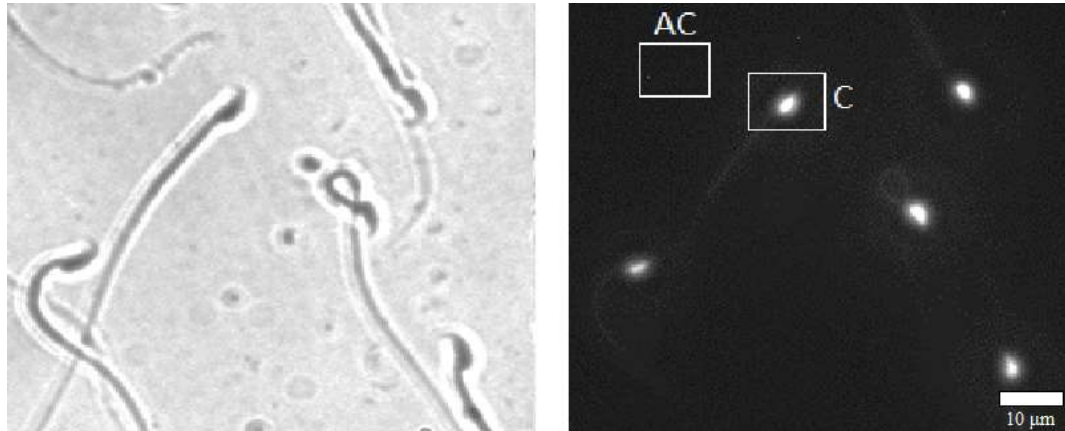


Figura 4.2 Micrografía en campo claro de espermatozoides de ratón (Izquierda) y micrografía de fluorescencia de espermatozoides de ratón incubados con Fluo4/F127 (Derecha). Se registró el cambio de fluorescencia de la cabeza (C) y se le elimino el ruido (AC)

#### 4.3.6 Análisis estadístico

Posterior al análisis de cada una de las células, se obtuvo un promedio de la respuesta de todas las células de cada grupo y se compararon con una prueba t de dos muestras entre grupos experimentales para determinar si existía alguna diferencia entre grupos, con una significancia estadística de  $P < 0.05$ .

Las células fueron obtenidas de un total de 40 ratones; para comparar la respuesta de un donador de  $\text{NO}^-$  y un activador de GCs, se utilizaron 20 ratones para los experimentos del estímulo de DNONO y 7 ratones para experimentos con el estímulo de YC-1. En los experimentos de inhibición en presencia de un donador de  $\text{NO}^-$  se utilizaron 10 ratones y para los experimentos de inhibición en presencia de un activador de GCs se utilizaron 11 ratones. La tabla 4.2 muestra el total de células que respondieron en cada grupo experimental, en cada grupo el porcentaje de respuesta fue del 40-50% de las células analizadas.

Tabla 4.3 Número de espermatozoides que respondieron al estímulo en cada grupo experimental.

	Comparación de DNONO y YC1		Inhibidores en experimentos con DNONO			Inhibición en experimentos con YC-1	
	DNONO	YC-1	Control (DNONO)	Inhibidor (NS2028)	Inhibidor (L-cis-D)	Control (YC-1)	Inhibidor (L-cis-D)
n	20	7	10	10	10	11	11
# células	82	54	201	132	110	260	187

n = número de ratones para cada grupo

# CAPÍTULO V

## **Resultados**

El NO<sup>•</sup> es un compuesto que altera la fisiología del espermatozoide de mamífero en los procesos previos a la fusión de membranas de los gametos dentro de la fecundación (hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal), todos estos eventos se asocian a un aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> esto por medio de mecanismos de regulación precisos pero que no se han dejado claros [27] [28].

En el espermatozoide el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> puede estar asociado a la activación de canales CNG que responden a segundos mensajeros, como el GMPc que se conoce que es producido en otros sistemas biológicos por la acción del NO<sup>•</sup>, que activa a la GCs, produciéndose un aumento de este segundo mensajero (GMPc) [55].

Con lo anterior y con el objetivo de explorar la vía de señalización del NO<sup>•</sup> en el espermatozoide y de la participación de los canales CNG en la misma, nos dimos a la tarea de evaluar los cambios de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el espermatozoide en respuesta a un donador de NO<sup>•</sup> (DNONO) y utilizando dos inhibidores, uno para la GCs y otro para los canales CNG, por otra parte se utilizó también un activador de la GCs no dependiente de NO<sup>•</sup> y el mismo inhibidor de los canales CNG. La vía de señalización que se propone que sigue el óxido nítrico es:



### **5.1 Evaluación de la respuesta a donador de óxido nítrico y activador de la guanilato ciclasa soluble**

Para evaluar los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, los espermatozoides de ratones sexualmente maduros se cargaron con 10 μM de Fluo-4 AM, midiendo los cambios de la intensidad de fluorescencia en el

tiempo, se pudo determinar de manera cualitativa la concentración relativa de calcio antes y después de los estímulos; ya sea con DNONO, un donador de óxido nítrico o con YC-1, un activador de la GCs soluble que es independiente de NO. En cada espermatozoide se observó el cambio de intensidad de fluorescencia en el área de la cabeza, como se muestra en la figura 5.1.



Figura 5.1 Micrografía de fluorescencia de un espermatozoide de ratón cargado con Fluo-4 AM. En la imagen se muestran la anatomía de un espermatozoide destacando cabeza y flagelo en el momento de su intensidad máxima al estímulo de YC-1.

Para cada espermatozoide sin capacitar se obtuvo el registro del cambio de intensidad de fluorescencia, restando la fluorescencia basal y el ruido de fondo, en la figura 5.2 se muestra un registro representativo de la respuesta observada ante ambos estímulos, DNONO y YC-1.

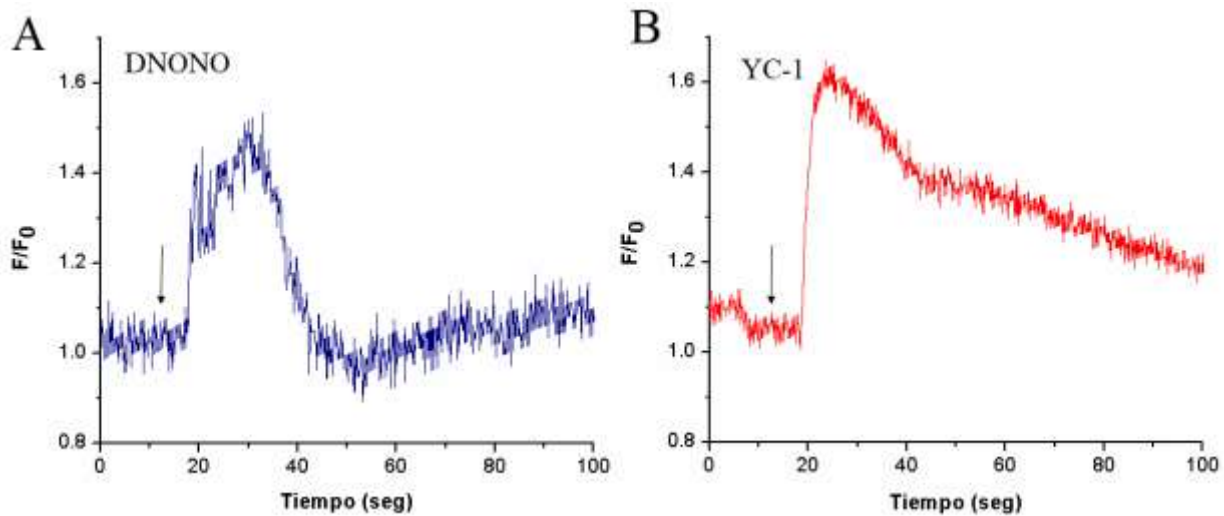


Figura 5.2 Registros representativos de la respuesta a estímulos de donador de óxido nítrico y activador de guanilato ciclasas solubles. En ambos gráficos se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia normalizada ( $F/F_0$ ) en respuesta a la adición externa para ambos estímulos, (flecha) el donador de  $\text{NO}^-$ , DNONO (A) y el activador de guanilato ciclasas, YC-1 (B).  $F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Como se puede ver en la figura 5.2, la respuesta observada para ambos grupos experimentales consiste en un incremento transitorio de la intensidad de fluorescencia, en respuesta a la adición externa de DNONO y YC-1 (flecha), en general la amplitud de la respuesta máxima fue similar para ambos grupos, aumentando la intensidad de fluorescencia en un  $38.98 \pm 1.87\%$  para la estimulación con DNONO y en un  $38.93 \pm 1.51\%$  para la estimulación con YC1 (figura 5.3).

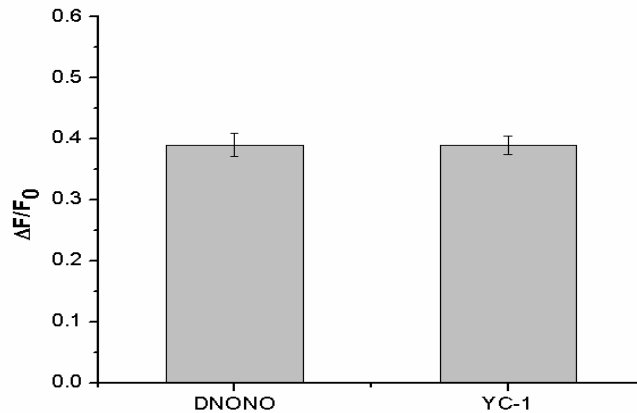


Figura 5.3 Amplitud máxima de la respuesta al donador de óxido nítrico, Dietilamina NONOato (DNONO) y al activador de guanilato ciclasa soluble, YC1. La amplitud máxima de la fluorescencia normalizada ( $\Delta F/F_0$ ) de espermatozoides de ratón, estimulados a DNONO y YC1, se compararon ambas amplitudes y se observó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos a una  $P < 0.05$ ;  $n = 20$  ratones para DNONO y  $n = 7$  ratones para YC-1.  $\Delta F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[Ca^{2+}]$ .

Los experimentos demostraron que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos para la amplitud máxima a la respuesta ante los estímulos externos aplicados.

## 5.2 Efecto de inhibidores sobre la actividad de donador de óxido nítrico

Para el fin de identificar la vía de señalización de óxido nítrico, la participación de la guanilato ciclasa soluble y el efecto final de la activación de los canales CNG se utilizaron dos inhibidores



que bloquearan el mecanismo que se propone que sigue el óxido nítrico, con un inhibidor de la GCs y un bloqueador de los canales CNG.

La figura 5.4 muestra registros representativos de células que respondieron a un estímulo externo de óxido nítrico que fue aplicado después de una incubación de 3 minutos para ambos inhibidores (NS 2028 y L-cis-D) en condición de oscuridad. Después de la preincubación con los inhibidores la adquisición de los videos se realizó de igual forma que con el grupo control sin inhibidor y se obtuvieron los cambios de intensidad de fluorescencia.

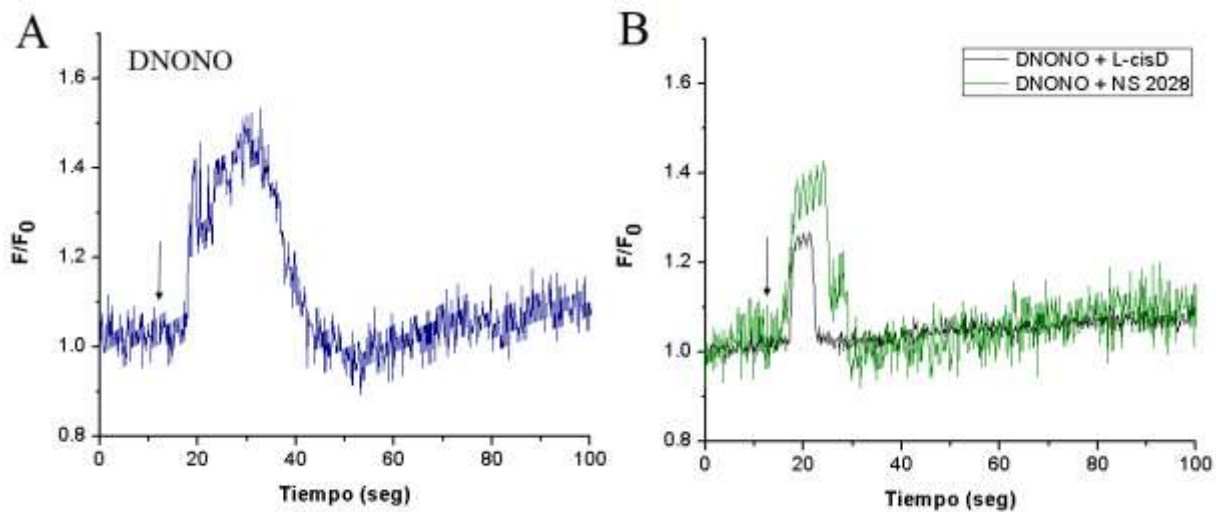


Figura 5.4 Registros representativos de la respuesta de espermatozoides de ratón a inhibidores y donador de óxido nítrico. En ambos gráficos se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia normalizado ( $F/F_0$ ) en respuesta a la adición externa de DNONO (flecha), se muestra un registro de espermatozoide control (A) comparándolo con los dos inhibidores preincubados (B), el inhibidor de GCs, NS 2028 (verde) y el bloqueador de los canales CNG, L-cis-D (negro).  $F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[Ca^{2+}]$ .

Puede verse en la figura 5.4 que al preincubar los espermatozoides tanto para NS 2028 como para L-cis-D existe una disminución en la amplitud máxima de fluorescencia, puede observarse que para ambos casos existen respuestas similares, observándose también una disminución en la duración de la respuesta transitoria.

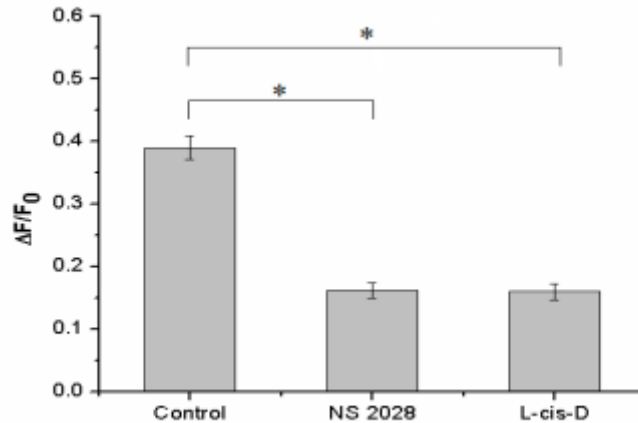


Figura 5.5 Amplitud máxima de la respuesta a inhibidores y donador de óxido nítrico. La amplitud máxima de la fluorescencia normalizada ( $\Delta F/F_0$ ) de espermatozoides de ratón, estimulados a DNONO (control) y dos inhibidores (NS2028 y L-cis-D) se compararon las amplitudes contra el grupo control y existe una diferencia significativa a una  $P < 0.05$  para Control vs NS2028 y Control vs L-cis-D;  $n=11$  ratones para control (DNONO),  $n=11$  para ambos inhibidores (NS 2028 y L-cis-D).  $\Delta F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[Ca^{2+}]$ .

Se puede observar en la figura 5.5 que el inhibidor de la GCs reduce la respuesta a la adición de NO de manera significativa en un  $58.49 \pm 1.27\%$ , y de igual forma el bloqueador de canales CNG reduce la respuesta de manera significativa en un  $59.03 \pm 1.29\%$ . Además, se observó que ambos inhibidores producen un efecto similar ya que se demostró que no existen diferencias significativas entre ambos grupos a los que se les preincubó con los inhibidores.

### **5.3 Efecto del bloqueo de canales CNG sobre la respuesta al activador de la Guanilato ciclasa soluble**

Para comprobar la participación de los canales CNG en el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  por la vía de la guanilato ciclasa soluble, se utilizó de igual forma el bloqueador de los canales CNG, L cis Diltiazem, el cual se preincubó en condiciones de oscuridad y después se le aplicó el estímulo externo de YC1, en la figura 5.6 se observa el cambio en la intensidad de la fluorescencia para el control y el grupo con los canales CNG bloqueados.

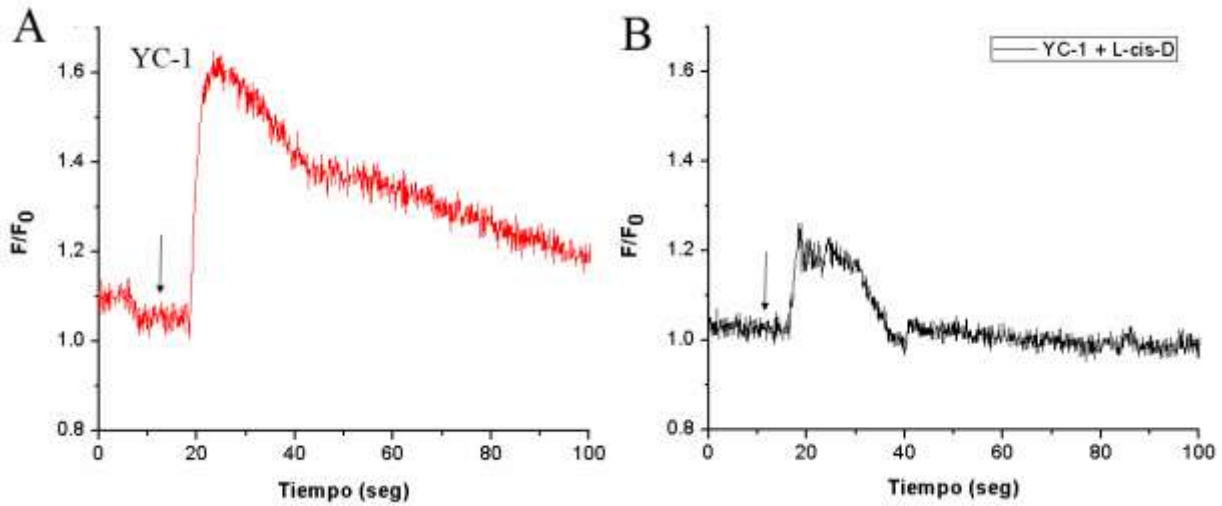


Figura 5.6 Registros representativos de la respuesta de espermatozoides de ratón a bloqueador de canales CNG y activador de guanilato ciclasas solubles. En ambos gráficos se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia normalizado ( $F/F_0$ ) en respuesta a la adición externa de YC-1 (flecha), se muestra un registro de espermatozoide control (A) comparándolo con el bloqueador de canales CNG preincubado (B), L-cis-D (negro).  $F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[Ca^{2+}]$ .

Se puede observar en la figura 5.6 que existe una disminución en la intensidad de fluorescencia máxima en espermatozoide del grupo que fue preincubado con un bloqueador de los canales CNG, comparándolo con el grupo control. En la figura 5.7 se puede observar que el L-cis-Diltiazem produce una disminución significativa de la respuesta a la activación de la Guanilato ciclasa soluble en un  $48.42 \pm 1.09\%$ .

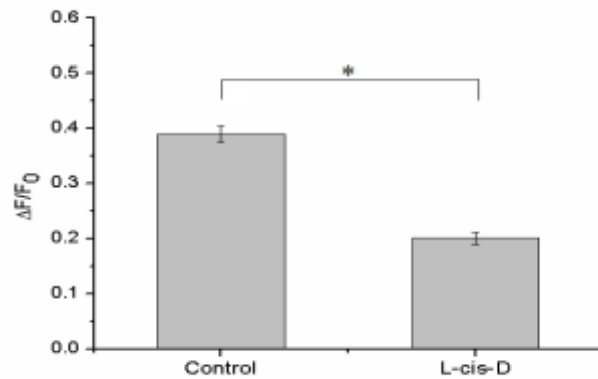


Figura 5.7 Amplitud máxima de la respuesta a bloqueador de canales CNG y activador de la guanilato ciclasa soluble. La amplitud máxima de la fluorescencia normalizada ( $\Delta F/F_0$ ) de espermatozoides de ratón, estimulados a YC-1 (control) y bloqueador de canales CNG (L-cis-D), se comparó la amplitud contra el

grupo control y existe una diferencia significativa a una  $P < 0.05$  Control vs L-cis-D;  $n=11$  ratones para control (YC-1),  $n=11$  para bloqueador de canales CNG (L-cis-D).  $\Delta F/F_0$  representa el cambio relativo en la  $[Ca^{2+}]$ .

En resumen, se vio un incremento en la concentración de calcio intracelular al adicionar un donador de óxido nítrico (DNONO) y del activador de la guanilato ciclasa (YC-1) en espermatozoides no capacitados. Observando la vía de DNONO se observó que al inhibir la GCs la amplitud máxima de fluorescencia disminuye significativamente, de igual modo que al bloquear los canales CNG; ambas disminuciones no demostraron una diferencia significativa entre ellos. Al estudiar la vía que sigue el YC-1 que no es dependiente de  $NO^-$  se observa que al inhibir los canales CNG existe una disminución significativa contra el grupo control, comparando la amplitud entre el grupo estimulado con DNONO y YC-1 y bloqueando los canales CNG no se observó una diferencia significativa entre ellos.



# CAPÍTULO VI

## **Discusión**

Ya se ha mencionado que en el proceso de fecundación en los mamíferos es de vital importancia para el espermatozoide pasar por cambios como la capacitación, la hiperactivación y la RA, donde el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel como segundo mensajero activando y regulando el desarrollo de estos procesos. Se ha visto que el  $\text{NO}^-$  liberado por donadores de  $\text{NO}^-$  en el espermatozoide aumenta el porcentaje de espermatozoides que se capacitan y que desarrollan el estado de hiperactivación y que por último logran, aumenta el porcentaje de espermatozoides que logran llevar a cabo la RA, sin embargo, los mecanismos por los que se logran estimular estos procesos en los espermatozoides de mamífero, aún no están bien determinados [2] [4] [28].

El espermatozoide posee mecanismos altamente especializados para regular y aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  según sus necesidades, obteniendo este calcio del espacio extracelular o de fuentes de calcio intracelulares, lo que tiene lugar a través de alteraciones en la permeabilidad de la membrana. La membrana plasmática del espermatozoide posee una amplia gama de complejos proteicos, canales iónicos y transportadores, que permiten la comunicación entre los espacios intracelular y extracelular [31] [33] [34].

Se ha visto que el óxido nítrico es un radical libre que se encuentra en el espacio uterino, participando en la generación de las contracciones que favorece el paso de los espermatozoide por esta cavidad, adicionalmente, recientes estudios han observado que el espermatozoide posee la maquinaria necesaria para poder responder a este compuesto, involucrándolo en los procesos fisiológicos por los que debe pasar para desarrollar una fecundación exitosa [23] [24] [27].

Nosotros proponemos que el  $\text{NO}^-$  influye directamente en el espermatozoide, como un activador de las vías de segundos mensajeros que regulan a una de las moléculas más importante para los procesos fisiológicos del espermatozoide, el  $\text{Ca}^{2+}$ . Anteriormente, estudios han demostrado que las vías de señalización por las cuales los gametos logran desarrollar su estado óptimo para la reproducción y el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  involucran la acción de los nucleótidos cíclicos. Por ejemplo, un análogo del GMPc, el 8Br-GMPc, es capaz de inducir un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

relativa en espermatozoides de ratón [64], sin embargo, no se ha estudiado cuales son los mecanismos por los cuales el espermatozoide produce este segundo mensajero.

En diversos sistemas biológicos, como el sistema cardiovascular, neuronas y sistema inmune, el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la producción de GMPc es mediada por la acción de la GCs, las cuales son activados por la entrada de  $NO^-$  a las células o por la producción de este radical libre por medio de la NOS [19] [20] [21].

Con el fin de comprobar si en el espermatozoide se presentaba esta misma vía de señalización se estudiaron los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides de ratón en respuesta a un donador de  $NO^-$ , el Dietilamina NONOato (DNONO); y ante un activador de GCs, el YC-1.

Los resultados demostraron que efectivamente el adicionar el DNONO se incrementó la  $[Ca^{2+}]_i$ , al comparar esta respuesta con la respuesta al estímulo externo de YC-1 se observó que no existe una diferencia significativa en el aumento de calcio, con lo que se puede suponer que la respuesta de las GCs es directamente proporcional a la entrada de  $NO^-$  y que no existe otra fuente externa que las active.

Siguiendo con el análisis de la vía de señalización que activa el  $NO^-$ , se bloquearon dos pasos en la cascada de señalización que, según nuestra hipótesis, participarían en el incremento del  $Ca^{2+}$ , uno inhibiendo la activación de la GCs y otro bloqueando los canales CNG. Al inhibir la GCs con NS 2028 los resultados arrojaron que existe una disminución significativa de la  $[Ca^{2+}]_i$ , a la dosis utilizada se inhibió alrededor del 60% de la respuesta máxima, con esto y con los resultados previos se corrobora que el  $NO^-$  activa directamente la GCs. Sin embargo, que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  no se haya inhibido por completo, nos indicaría que el  $NO^-$  está actuando también por otros mecanismos, por ejemplo, el  $NO^-$  puede reaccionar con el ion superóxido ( $O_2^-$ ), para producir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un potente oxidante que se ha demostrado que puede afectar la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  produciendo la salida de este ion de la mitocondria [65][66]; otro mecanismo sería que el peroxinitrito desencadene la nitrosilación de proteínas involucradas en la regulación del  $Ca^{2+}$ , como se ha visto en miocitos donde el receptor de Ryanodina (RyR) se ve modulado por su nivel de nitrosilación, donde al disminuir la nitrosilacion del RyR, disminuye su probabilidad de apertura [67].

Una curva de dosis-respuesta podrá comprobar cuál es el porcentaje real en que participa la GCs y el otro porcentaje puede ser a otras vías de señalización asociadas a adenilato ciclasas pero de las cuales tampoco queda claro su mecanismo de acción.

Por otro lado, al analizar la participación de los canales CNG en la vía de señalización propuesta, los resultados obtenidos señalan que al inhibir estos canales de igual forma solo disminuye alrededor de un 50% el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , inducida por el NO, que al ser comparado con el grupo en inhibición de GCs no existe una diferencia significativa, esto respalda nuestra hipótesis de que los segundos mensajeros GMPc activados por la GCs actúan directamente sobre los canales CNG y estos son parcialmente responsables del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , sin embargo al no observarse un mayor porcentaje de inhibición, podría ser que el GMPc generado por las GCs este activando otros mecanismos, como por ejemplo, alguna vía de señalización que de manera indirecta regule la  $[Ca^{2+}]_i$ , vía cascadas de fosforilación mediante la activación de proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG) como se ha observado en espermatozoides de humano donde la vía de señalización que involucra a la PKG regula el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular en la respuesta de quimiotaxis inducida por progesterona [68], o regulando alguno de los transportadores que liberan el  $Ca^{2+}$  de las pozas intracelulares o la entrada del mismo desde el medio extracelular [69].

Al haber comprobado que la respuesta final entre el grupo estimulado con DNONO y YC-1 no mostraba una diferencia significativa se continuo con los experimentos con YC-1 y L-cis-D debido a la mayor estabilidad del primer compuesto y los resultados fueron como se esperaba similares, existe una disminución en la amplitud de la respuesta máxima en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Estadísticamente esta disminución entre grupos de DNONO con L-cis-D y de YC-1 con L-cis-D no muestran una diferencia significativamente. Sin embargo pese a no ser significativamente diferentes las diferencias, el grupo con DNONO con NS2028 obtuvo una amplitud promedio mayor al grupo de DNONO con L-cis-D, de igual forma el grupo de YC-1 con L-cis-D obtuvo una amplitud promedio mayor que el grupo de DNONO con L-cis-D, que aunque no significativa nos puede sugerir que por sí mismo el reactivo YC-1 tiene una mayor estabilidad que el reactivo DNONO, o proponer como ya mencionamos anteriormente la activación de otra vía de señalización en la que esté involucrados el NO<sup>-</sup>, la GCs o el GMPc, la forma de comprobar esta nueva hipótesis seria desarrollar nuevo experimentos que afecten la formación de peroxinitrito, los niveles de nitrosilación de proteionas o alteren la activación de la PKG, así como por el bloqueo de otros canales iónicos.



Cabe mencionar que las dosis utilizadas de activadores e inhibidores utilizadas en este trabajo son las dosis similares a las reportadas en las que, en otros sistemas, se observaba el mayor efecto [2] [70] [71] [72], sin embargo, no se debe descartar que la variación en las dosis aplicadas en el diseño experimental pueda variar los resultados observados.

Adicionalmente, algunos estudios sugieren que otros canales iónicos del espermatozoide, como los canales CatSper, pueden ser modulados en presencia de nucleótidos cíclicos, pese a no tener un sitio de unión directo a estos mensajeros, queda como tal que pueda existir una cooperatividad de los canales CNG y GCs en la activación de otros canales [63].

Con todo lo anterior en la figura 6.1 se establece un diagrama de la cascada de señalización que se describió con los resultados del presente estudio.

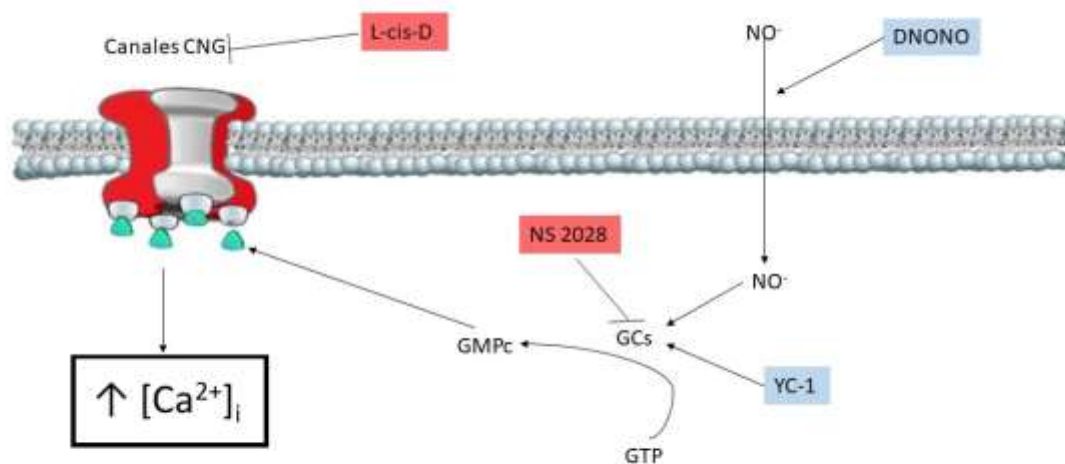


Figura 6.1 Vía de señalización del NO en el espermatozoide de ratón basada en los resultados. Se observa que el NO permea en la membrana al ser adicionado de forma externa como un donador de NO (DNONO) el cual activa la GCs que permite la conversión de GTP en GMPC y que al unirse a los canales CNG aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$ . En azul se señalan los compuestos que muestran un aumento en la respuesta y en rojo los inhibidores que disminuyeron la  $[Ca^{2+}]_i$ .

# CAPÍTULO VII

## **Conclusiones**

Con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se logró determinar que:

- La Guanilato Ciclasa soluble (GCs) participa en la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta al  $\text{NO}^-$  en espermatozoides de ratón.
- Los canales catiónicos activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG) participan en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de ratón en respuesta al  $\text{NO}^-$ .

Con esto podemos decir que el  $\text{NO}^-$  induce el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el espermatozoide de ratón en parte por medio de una vía de señalización en donde se activa la Guanilato Ciclasa soluble, la cual a su vez produce GMPc, que estaría activando los canales catiónicos activados por nucleótidos cíclicos permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma del espermatozoide.

Con esto queda claro que el  $\text{NO}^-$  es un elemento importante en la fecundación y que en el espermatozoide de ratón favorece el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , necesario para la interacción y fusión de los gametos y por tanto para la formación de un nuevo ser; con este estudio queda más claro el mecanismo por el cual todo este proceso ocurre.



# CAPÍTULO VIII

## **Perspectivas**

Durante la realización de este trabajo fue posible describir el mecanismo de acción del NO<sup>-</sup> dentro de la fisiología del espermatozoide de ratón, y demostrándose que actúa por acción de la GCs y la activación de los canales CNG, sin embargo, surge la pregunta de qué otras vías de señalización pueden verse involucradas en respuesta al NO<sup>-</sup> o si existe la participación de otros canales iónicos permeables a Ca<sup>2+</sup> en esta respuesta.

Las dosis utilizadas en el diseño experimental fueron seleccionadas con base en otros estudios que proponen estas concentraciones para todos los reactivos, sin embargo se puede esclarecer más sobre el porcentaje real en que participa el NO<sup>-</sup> y la GCs si se realiza una curva de dosis-respuesta, debido a que como todos los compuestos y por la naturaleza del NO<sup>-</sup> de ser un radical libre, a dosis muy elevadas se ha comprobado que tiene efectos nocivos en otros sistemas biológicos llevando a patologías.

De la misma manera sería importante medir en cuanto aumenta la concentración de GMPc total dentro de la célula a diferentes dosis del donador de NO<sup>-</sup> para establecer con esto una dosis efectiva en que se mejore la calidad de los espermatozoides.

Por último, todos los experimentos se realizaron en espermatozoides no capacitados, esto porque se ha visto que el NO<sup>-</sup> participa en todos los procesos previos a este evento biológico, sin embargo, sería importante realizar estos experimentos en espermatozoides que ya han sido capacitados para comprobar que efecto tiene el NO<sup>-</sup> en este proceso.



# Referencias

- [1] A. Darzson, G. O. Young, “Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo” *Biotecnología* 14, pp. 29-42, 2014.
- [2] A. Cisneros Mejorado, D. P. Sánchez Herrera, “cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation, *FEBS Letters* 586, pp. 149-153, 2012.
- [3] E. M. Eddy, *The Physiology of Reproduction*”, ed. Knobil, E. y Neill, J. et al., Raven Press Ltd., New York, pp. 27, 1988.
- [4] R. Ward, B. T. Storey, “Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay”, *Developmental Biology*, vol. 104, no. 2, pp. 287-296, 1987.
- [5] H. Breitbart, “Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 187, no 1-2, pp. 139-144, 2002.
- [6] S. Gilbert, “Fecundación: el comienzo de un nuevo organismo”, *Biología del desarrollo*. 7ª. Edición. Sinauer Assoc., Sunderland. Capítulo 7, pp. 207-221, 2005.
- [7] R. Jansen, “Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport”. *Science* 201 pp. 349, 1978.
- [8] P.E. Visconti, J.L. Bailey, G.D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, G.S. Kopf, “Capacitation of mouse spermatozoa. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation”, *Development*, vol. 121, no 4, pp. 1129-1137, 1995.
- [9] M. B. Herrero, “Evidencias sobre la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en el espermatozoide murino y su participación en el proceso de fertilización”, *Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*, pp.1-44, 1996.
- [10] A. G Dickson, C. Goyet, C. “Handbook of method for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water”, version 2. ORNL/CDIAC-74., 1994.
- [11] T. M. Devlin. “Bioquímica”, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4, 2004.
- [12] A. Darzson, T. Nishigaki, C. Wood, C. L. Treviño, R. Felix, C. Beltran, “Calcium Channels and Ca<sup>2+</sup> Fluctuations in Sperm Physiology” *International Review of Cytology*, Vol. 243, pp. 79-172, 2005.

- [13] H. Sirakawa, "Spatiotemporal characterization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida", *Development Biology* vol. 208, no. 1, pp. 70-78, 1999.
- [14] N. Mendoza, "Farmacología medica" 1a edición, Medica Panamericana, pp. 4-14, 2008.
- [15] L. C. Green, S. R. Tannenbaum, P. Goldman, "Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat" *Science* 212 pp. 56, 1981.
- [16] J. P. Cristol, M. C. Guérin, J. Toreilles "Measurements of nitric oxide and biological systems. CR Acad Sci Paris, 317, pp. 549-560, 1994.
- [17] L. J. Ignarro, G. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chauhuri, G., "Endothelium-derived relaxing factor produced and released artery and vein is nitric oxide" *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 84 pp. 926, 1987.
- [18] J. S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J. P. Crow, "Oxidative chemistry of peroxynitrite" *Methods Enzymol*, 233 pp. 229-240, 1994.
- [19] J. E. Hall, "Guyton and Hall, Textbook of Medical Physiology", 20a edición, Elsevier Saunders, pp. 195-197, 2011.
- [20] H. H. Schmidt, J. S. Pollock, M. Nakane, U. Forsternann, "Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon" *F. Murad, Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 88, pp. 365, 1991.
- [21] J. B. Hibbs, R. Tavor, V. Vovrin, D. Granger, J. Drapier, J. Anher, R. Lancaster, "Nitric Oxide from L-arginine: A bioregulatory system", Elsevier, Amsterdam, pp. 189, 1990.
- [22] V. Rettori, N. Belova, W. Dees, C. Nyberg, M. A. Gimeno, S. McCann, "Nitric Oxide: A Novel Mediator of Sperm Function" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 pp. 130, 1993.
- [23] A. Franchi, M. Chaud, V. Rettori, A. Suburo, S. McCann, "Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri" *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 91, pp. 539, 1994.
- [24] Yanaghachi, R, *Mammalian Fertilization*, ed. Knobil, E. y Neill, J., Raven Press Ltd., New York, pp. 189, 1994.
- [25] J. A. Lugg, N. F. Gonzalez, J. Rajfer, J. "Androgenic Regulation of NO Availability in Rat Penile Erection" *Journal Andrology* 16, pp. 2, 1995

- [26] A. Burnett, A. D. Ricker, S. Chamness, M. Maguire, J. Crone, "Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat", *Biol. Reprod* 52 pp. 1, 1995
- [27] M.B. Herrero, "Nitric oxide A Novel Mediator of sperm Funcion", *Journal of Andrology* Vol. 22, no. 3, 2001.
- [28] A. Zini, "Low Levels of Nitric Oxide Promote Human Sperm Capacitation in vitro", *Journal of Andrology*, Vol. 16, pp. 424-430, 1995.
- [29] M. Cooper, "La célula", 5ª edición, Ed. Marbán, pp. 470-471, 2009
- [30] B. Alberts, "Introducción a la Biología Celular", 2ª edición, Ed. Médica Panamericana, pp. 375-376, 2011
- [31] B. Alberts, "Biología Molecular de la célula", 4ª edición, Ed. Omega, pp. 595, 2010
- [32] J. Reece, L. Urry, M. Cain, R. Jackson, "Membrane structure and function", 10ª edición, Pearson, pp. 127, 2011
- [33] B. Hille, "Ion Channels of Excitable Membranes", Sinauer Associates, Sunderland, 2001.
- [34] E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, M. Brini, "Generation, control, and processing of cellular calcium signals". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, pp. 107–260, 2001.
- [35] M. Berridge, M. Bootman, H. Roderick, "Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodeling". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, pp. 517–529, 2003.
- [36] T. Nishigaki, C. Wood, Y. Tatsu, T. Furuta, K Shiba, S. Baba, A. Darszon, "A sea urchin egg jelly peptide induces cGMP-mediated decrease in sperm intracellular  $Ca^{2+}$  before its increase", *Dev. Biol.* 272, pp. 376–388, 2004.
- [37] W. Catterall, J. Striessnig, T. Snutch, E. Perez Reyes, "International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: Calcium channels", *Pharmacol. Rev.* 55, pp. 579–581, 2003.
- [38] W. Catterall, "Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels", *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, pp. 521–555, 2000.
- [39] E. Perez-Reyes, "Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels", *Physiol. Rev.* 83, pp. 117–161, 2003.



- [40] F. Espinosa, A. Darszon, "Mouse sperm membrane potential: Changes induced by  $\text{Ca}^{2+}$ " FEBS Lett. 372, 119–125, 1995.
- [41] H. Shirakawa, S. Miyazaki, "Spatiotemporal characterization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida", *Developmental Biology*, 208, pp. 70-78, 1999.
- [42] U. Wissenbach, B. Niemeyer, V. Flockerzi, "TRP channels as potential drug targets", *Biol. Cell* 96, pp. 47–54, 2004.
- [43] C. Montell, "The venerable inveterate invertebrate TRP channels", *Cell Calcium*, 33, pp. 409–417, 2003.
- [44] C. Zitt, C. Halaszovich, V. Luckho, "The TRP family of cation channels: Probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry", *Prog. Neurobiol.* 66, pp. 243–264, 2002.
- [45] M. K. Jungnickel, H. Marrero, L. Birnbaumer, J. Lemos, H. M. Florman, "TRP2 regulates entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm triggered by egg ZP3", *Nat. Cell Biol.* 3, pp. 499–502, 2001.
- [46] X. Z. Xu, P. Sternberg, "A *C. elegans* sperm TRP protein required for sperm–egg interactions during fertilization", *Cell* 114, pp. 285–297, 2003.
- [47] A. Zhang, F. Yi, E. Teggtatz, A. Zou, P. Li, "Enhanced production and action of cyclic ADP-ribose during oxidative stress in small bovine coronary arterial smooth muscle" *Microvasc. Res.* 67, pp. 159–167, 2004.
- [48] O. Zapata, J. Ralston, C. Beltrán, J. Parys, J. Chen, F. Longo, A. Darszon, "Inositol triphosphate receptors in sea urchin sperm", *Zygote* 5, pp. 355–364, 1997.
- [49] A. Darszon, J. Acevedo, B. Galindo, E. Hernandez Gonzalez, T. Nishigaki, C. Treviño, C. Wood, C. Beltran, "Sperm channel diversity and functional multiplicity", *Reproduction*, 131, pp. 977-988, 2006.
- [50] T. A. Quill, S. A. Sugden, K. Rossi, L. Doolittle, R. Hammer, D. Garbers, "Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, pp. 14869–14874, 2003.
- [51] A. E. Carlson, R. Westenbroek, T. Quill, D. Ren, D. E. Clapham, B. Hille, D. Garbers, D. F. Babcock, "CatSper1 required for evoked  $\text{Ca}^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, pp. 14864–14868, 2003.

- [52] D. Ren, B. Navarro, G. Perez, A. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, D. Clapham, “A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility”, *Nature* 413, pp. 603–609, 2001.
- [53] U. Kaupp, R. Seifert, “Molecular diversity of pacemaker ion channels” *Annu. Rev. Physiol.* 63, pp. 235–257, 2001.
- [54] J. Ludwig, T. Margalit, E. Eismann, D. Lancet, U. Kaupp, “Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium”, *FEBS Lett.* 270, pp. 24–29, 1990.
- [55] Z. Wang. *Ion channels: from structure to function* 392–402, 1<sup>a</sup> Edición, Oxford University Press, 2010.
- [56] U. Kaupp, R. Seifert, “Cyclic nucleotide-gated ion channels”, *Physiol. Rev.* 82, pp. 769–824, 2002.
- [57] I. Weyand, M. Godde, S. Frings, J. Weiner, F. Muller, W. Altenhofen, H. Hatt, U. Kaupp, “Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm” *Nature* 368, pp. 859–863, 1994
- [58] A. Gerstner, X. Zong, F. Hofmann, M. Biel, M. “Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina” *Journal Neurosci.* 20, pp. 1324–1332, 2000.
- [59] B. Wiesner, J. Weiner, V. Middendor, V. Hagen, U. Kaupp, I. Weyand, “Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control  $Ca^{2+}$  entry into sperm” *Journal Cell Biol.* 142, pp. 473–484, 1998.
- [60] C. Dzeja, V. Hagen, U. Kaupp, S. Frings, “ $Ca^{2+}$  permeation in cyclic nucleotide-gated channels”. *EMBO J.* 18, pp. 131–144, 1999.
- [61] M. Biel, M. Seeliger, A. Pfeifer, K. Kohler, A. Gerstner, A. Ludwig, G. Jaissle, S. Fauser, E. Zrenner, F. Hofmann, “Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, pp. 7553–7557, 1999.
- [62] B. Minke, B. Cook, “TRP channel proteins and signal transduction”, *Physiol. Rev.* 82, pp. 429–472, 2002.
- [63] O. Podlaha, J. Zhang, “Positive selection on protein-length in the evolution of a primate sperm ion channel”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, pp. 12241–12246, 2003.

- [64] A. Cisneros Mejorado, L. Hernández Sobernais, M. C. Islas Carbajal, D. Sánchez, “Capacitation and Ca<sup>2+</sup> influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G” *Andrology*, pp. 1-10, 2013.
- [65] M.A. Pacher, M.P. Murphy, “Packer MA, Murphy MP, “Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A”, *FEBS Lett.* 345(2-3), pp. 237-240, 1994.
- [66] M. C. Benavides Trujillo, A. Pinzón Tovar, “Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas” *Rev. colomb. anestesiología*. 36:1, 2008
- [67] H. Wang, S. Viatchenko Karpinski, J. Sun, I. Györke, N.A. Benkusky, M. J. Kohr, H.H. Valdivia, E. Murphy, S. Györke, M.T. Ziolo, “Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: Role of ryanodine receptor S–nitrosylation”, *J Physiol.* 588 pp.2905–2917, 2010.
- [68] M.E. Teves, H.A. Guidobaldi, D.R. Uñates, R. Sanchez, W. Miska, S.J. Publicover, A.A. Morales Garcia, L.C. Giojalas, “Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone”, *PLoS One.* 4(12):e8211, 2009.
- [69] J. Correia, F. Michelangeli, S. Publicover, “Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm”, *Reproduction.* 50(2) pp. 65–76, 2015.
- [70] K.O. Feng Nien, W. Chin Chung, K. Sheng Chu Kuo, L. Fang Yu, T. Che Ming, “YC-1, a Novel Activator of Platelet Guanylate Cyclase”, *Blood* 84(12) pp. 4226-4233, 1994.
- [71] N. J Edin, J.A. Sandvik, H.S Vollan, K. Reger, A. Görlach, E.O. Pettersen, “The role of nitric oxide radicals in removal of hyper-radiosensitivity by priming irradiation”, *J Radiat Res*, 54 (6) pp. 1015-1028, 2013.
- [72] S.P. Olesen, J. Drejer, O. Axelsson, P Moldt, L. Bang, J.E. Nielsen Kudsk, R. Busse, A. Mülsch, “Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase”, *British Journal of Pharmacology*, 123(2) pp. 299-309, 1998.