Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Monterrey

Efecto del xenón en los espermatozoides de ratón

Tesis que presenta:

Samuel Salinas Almaguer

para obtener el grado de Maestría en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León *Agosto,2013*

Agradecimientos

Quisiera agradecer...

A mis padres y a mis hermanas por su apoyo incondicional durante toda mi carrera profesional, ya que sin su ayuda y buenos consejos no estaría donde me encuentro ahora.

Al Dr. J. Carlos Ruiz Suárez por permitirme trabajar bajo su dirección y por sus sugerencias durante la realización de mi proyecto de tesis.

A Humberto Reyes Pardo y Francisco J. Sierra Valdez por sus valiosas sugerencias y ayuda durante la etapa experimental de este proyecto.

A Ana Ilse Benavides Lahnstein, Dulce Citlalli Martínez Peón, Rosendo Perez Isidoro e Israel Campos Villalobos por brindarme su amistad y apoyo durante esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el soporte brindado durante la realización de este posgrado.

Índice

1. Introducción **1**

1.1. Anestésicos generales 1

1.2. Xenón 1

1.3. Los espermatozoides 6

2. Objetivos **9**

2.1. *Objetivo general* 9

2.2. *Objetivos particulares* 9

3. Metodología **10**

3.1. Aspectos técnicos 10

3.1.1. Obtención de los espermatozoides 10

3.2. Arreglo experimental 11

3.3. Software 12

3.3.1. Captura de imágenes 12

3.3.2. Análisis de las imágenes 12

3.4. Grupos experimentales 14

3.4.1. Temperatura constante de 25 °C 14

3.4.2. Efecto del xenón a 12 atmósferas 14

3.4.3. Xenón a 10 atmósferas 14

3.5. Gráficas del parámetro de la motilidad τ por grupo 15

3.6. Ajuste de los datos 15

4. Resultados **18**

5. Discusión **21**

6. Conclusiones **22**

Referencias **23**

Resumen

Este trabajo estudia el efecto del xenón en células aisladas (espermatozoides de ratón) con el fin de tratar entender los efectos que produce este gas inerte a escalas mayores en el cuerpo.

Con el fin de estudiar el efecto que el xenón ejerce en las células es llevado a cabo un estudio de la motilidad de los espermatozoides de ratón bajo condiciones de estrés por temperatura y por perdida gradual de glucosa por un periodo de 17 horas a presión atmosférica y presiones de hasta 12 atmósferas de xenón y nitrógeno.

Los resultados muestran que los espermatozoides en presencia de xenón mantienen la misma motilidad inicial por un mayor tiempo en presencia del xenón comparado contra un grupo control, lo que apunta a que el xenón ejerce un efecto protector en estas células.

Abstract

In this work we study the effect of xenon over isolated cells (mice's spermatozoa) to understand the effect that this inert gas has at larger scales on the body.

In order to study the effect of xenon exerts on the cells, a motility study of the mice's spermatozoa has been done. This motility study considered special conditions in which the mice's spermatozoa were under stress conditions by temperature and gradual glucose disminutions over a period of 17 hours at atmospheric pressure and other pressures up to 12 atmpsheres of xenon and nitrogen.

The results showed that mice's spermatozoa in the presence of xenon keeps the same initial motility over a longer period of time in contrast to a control group, which points that xenon exerts a protective effect over these cells.

1. Introducción

1.1. Anestésicos generales

Los anestésicos generales son drogas que deprimen el sistema nervioso central a un grado suficiente que permite la realización de intervenciones quirúrgicas u otros procedimientos nocivos o desagradables [1].

Debido a la cantidad de sitios de acción de los anestésicos generales (sitios de unión en proteínas, cavidades de proteínas, interfaces lipido-proteína e interfaces proteína-proteína, etc.) y al no existir un acuerdo ampliamente aceptado sobre los mecanismos por los cuales ocurre la anestésia general, solo es posible estudiar los sitios de interacción que presentan sin decidir si son relevantes o no al describir sus efectos. Por lo tanto, el mecanismo por el que se produce la anestesia general sigue siendo uno de los grandes problemas sin resolver en la neurofarmacología [2].

Dada la complejidad en las estructuras químicas de los anestésicos generales empleados hoy en día, entender el mecanismo de acción del xenón (un simple gas monoatómico), podría ser pieza clave para elucidar el mecanismo por el que se produce la anestesia general.

1.2. Xenón

El xenón es un elemento químico descubierto en 1898 por Sir William Ramsay profesor de química de la University College London, mediante destilación fraccionada del aire. Su nombre, que proviene del griego significa "extraño". Es un elemento químico que pertenece a la familia de los gases inertes que está presente en la atmósfera en un porcentaje no mayor a $8.75x10^{-6}$ %.

Al igual que el resto de los gases inertes el xenón se caracteriza por no interaccionar

tan fácil con otros elementos. Sin embargo, debido a su polarizabilidad tiende a formar enlaces de tipo Van der Waals. Esta polarizabilidad instantánea es lo que le permite interaccionar débilmente con otras moléculas tales como la mioglobina [3].

Recientemente ha surgido un interés en su uso en el área de la medicina donde se ha encontrado que tiene aplicaciones como protector de órganos [4] y anestésico general[5].

Algunas características que hacen atractivo el uso del xenón son:

- Debido al bajo coeficiente de partición sangre/gas (0.12), presenta una rápida inducción y recuperación en el organismo[2].
- Debido a su naturaleza poco reactiva no interacciona con ningún otro fármaco en el organismo ni es metabolizado.
- Cruza rápidamente la barrera hemato-encefalica[5].
- No causa ningún cambio significativo en la contracción cardíaca, presión sanguínea ni en la resistencia vascular sistémica aún bajo enfermedades cardíacas[7].
- Debido a que es un gas obtenido de la atmósfera no representa una amenaza como contaminante al medio ambiente.

Actualmente hay dos teorías que intentan explicar la interacción del xenón en los seres vivos, la primera de ellas es por medio de receptores celulares. Existe evidencia de la interacción del xenón con los subtipos de receptores a glutamato, NMDA (donde por medio de experimentos con la técnica de patch-clamp en neuronas hipocampales de rata [6], se encontró que el xenón inhibe su capacidad excitatoria al igual que el antagonista selectivo AP5, por lo que se considera que el xenón actúa como un antagonista a dichos receptores) y AMPA (donde está reportado que juega un papel en su desensibilización[7]).

Esta reportado que 0.5 atmósferas de xenón tienen un efecto *neuroprotector*[1] contra la hypoxia e isquemia en condiciones in vitro cuando es aplicado antes de una lesión o después de un lapso de 3 horas después de ocurrida[4].

El primer reporte de un tratamiento neuroprotector proviene de los antiguos griegos, quienes utilizaban la hipotermia para tratar los dolores de cabeza. En la actualidad se ha encontrado que el xenón en conjunto con la hipotermia se combinan de forma sinérgica como neuroprotectores en contra de la asfixia neonatal, efecto probado en un modelo con ratas[8], donde se indujo apoptósis y necrosis in vitro por medio pruebas de privación de oxigeno y glucosa, además de la adición de NMDA ($300\mu M$) y glutamato ($300\mu M$).

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores en el sistema nervioso[9], sin embargo una sobreestimulación puede resultar tóxica tanto para las neuronas como parar las células gliales [10]. En el trabajo de Pamela Sun y colaboradores, se explica el tren de eventos que desencadena el daño a nivel celular de las neuronas:

...Las funciones neuronales y de supervivencia dependen de un suministro constante de oxígeno y glucosa para producir ATP a través de glicolisis y respiración mitocondrial. En condiciones de isquemia e hipoglicemia (cerebral), un déficit de energía resulta en la disfunción de la liberación de neurotransmisores presinápticos y conlleva a un incremento neto del glutamato extracelular, causando neurotoxicidad. El exceso de glutamato activa sus receptores postsinapticos, llamados NMDA, AMPA y KAINATO. La actividad de los receptores de AMPA despolariza la célula y simultáneamente desbloquea los canales NMDA (removiendo el bloqueo por iones Mg^{2+}), permitiendo así la entrada de Ca^{2+}. La despolarización abre los canales de calcio activados por voltaje permitiendo la entrada de iones Ca^{2+} que debido a una sobreestimulación eventualmente se acumulan y bajan el gradiente osmótico en la célula, sometiendo a la célula a citotoxicidad.

[1]Un neuroprotector es un agente que previene la muerte o degeneración neuronal mediante la inhibición de uno de los pasos en el proceso que sigue al daño del sistema nervioso o isquemia debido a la oclusión de una arteria o hipoxia[11].

El retículo endoplasmatico y la mitocondria actúan como un vasto almacén y como reguladores de Ca^{2+}. Mas allá de un punto crítico, la sobrecarga de calcio interrumpe la función mitocondrial. Lo que promueve la activación de sistemas enzimáticos incluyendo lipasas, proteasas y endonucleasas, que causan una abrumadora producción de radicales libres, síntesis de óxido nítrico, MAP quinasas (MAPK) y productos tóxicos de las reacciones, llevando a una muerte neuronal. La membrana interna de la mitocondria es rota y causa la oxidación de las proteínas involucradas en la producción de ATP, reduciendo la energía disponible para las bombas de la membrana celular, resultando en apoptosis [12].

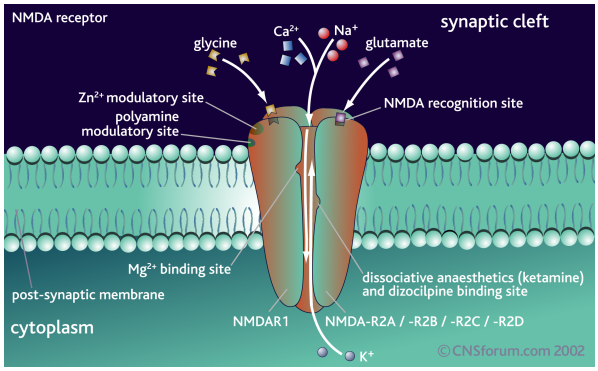

Figura 1: Los receptores NMDA son un subtipo de receptor de glutamato activados por un ligando y por voltaje, que regulan el flujo hacia el interior de las célula los iones Na^{+} y Ca^{2+}.

El uso de antagonistas de los receptores NMDA parece ser una pieza clave para reducir el daño neuronal. Existen reportes del uso de antagonistas de los receptores NMDA como protectores celulares tal como Licostinel [13], MK801 [14] y Gavestinel [4], sin embargo muchos de estos antagonistas no son tan efectivos debido a que no pasan la barrera hemato-encefálica tan fácilmente, lo que vuelve especialmente atractivo al xenón.

Además del efecto neuroprotector del xenón, hay evidencia de un efecto cardioprotector en un modelo de isquemia miocárdica en corazones de rata in vivo vía inducción de PKC-ϵ y p38 MAPK[15].

El efecto del xenón sobre los receptores NMDA parece explicar la mayoría de los

efectos que este ejerce sobre el cuerpo, sin embargo no explica una depresión en el metabolismo de la glucosa en el cerebro [16], efecto contrario al reportado en otros antagonistas tal como la ketamina [17]. Por lo que la sola interacción del xenón con los receptores NMDA no explica todos los efectos que produce en el cuerpo.

Otra teoría que intenta explicar el efecto anestésico del xenón se basa en la interacción con los fosfolípidos que componen la membrana de las células [18]. En donde se encontró que el xenón debido a su naturaleza hidrofóbica tiende a meterse en la región de las colas de los fosfolípidos que componen las membranas celulares, de manera que ocurre una desorganización de las colas de los fosfolípidos, además de predecir una reversión de este efecto ante un incremento de presión, hallazgo encontrado en otros anestésicos generales como el etanol y carbamato de etilo (donde se logro revertir su efecto anestésico en renacuajos con una presión hidrostática de 200-300 atm. [19]), además de halotano y metoxifluorano [20].

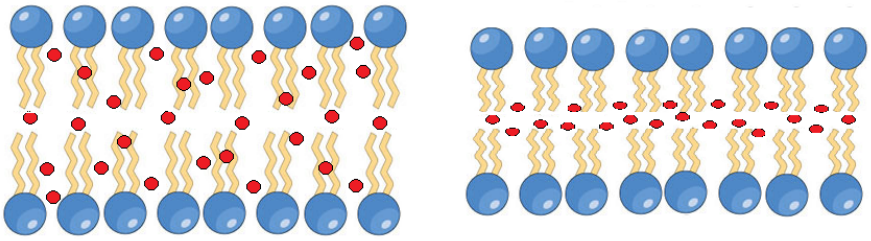

Figura 2: Izquierda: Distribución del xenón (rojo) en una bicapa lipídica a baja presión. Derecha: Distrubución del xenón (rojo) en una bicapa lipídica a alta presión, se observa una disminución en el área de las colas de los lípidos así como una distrubución de los átmos de xenón.

Esta fluidización del xenón concuerda con la solubilidad reportada pare este y otros anestésicos generales en lípidos, relación conocida como la correlación de Meyer-Overton, que establece que el efecto anestésico de una droga es proporcional a su solubilidad en el aceite de oliva puro, efecto que podría implicar un cambio en la permeabilidad de las neuronas al transito de los iones a su interior y explicar de esta forma el efecto anestésico.

Actualmente el uso del xenón con fines clínicos esta aprobado en Rusia y Alemania

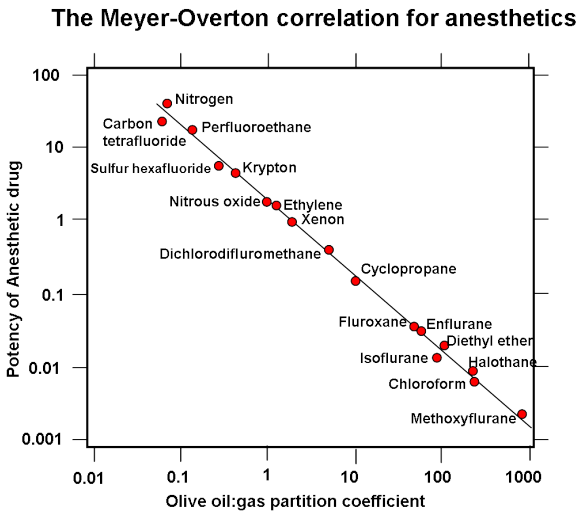

Figura 3: Correlación de Mayer-Overton.

[21]. Sin embargo, debido al alto precio del xenón comparado con otros anestésicos generales (2000 veces mas caro comparado con el óxido nitroso) y con otros gases órgano-protectores más baratos tal como el helio o hidrógeno, su uso permanece reservado para las aplicaciones que ameriten su elevado precio (10 dolares por litro).

A pesar de los estudios llevados a cabo sobre la interacción del xenón con diversos tejidos (cerebro, corazón) aún no hay ningún reporte de su efecto en células aisladas, lo que podría brindar un eslabón más para entender su mecanismo de acción y explicar los diversos efectos que ejerce en los seres vivos.

1.3. Los espermatozoides

En el presente trabajo se estudia la interacción del xenón en los espermatozoides de ratón a través de un estudio temporal de su motilidad.

Los espermatozoides de ratón son células haploides de forma falciforme, que constan principalmente de una cabeza y un flagelo. Dentro de la cabeza se encuentra ADN dentro de un núcleo, organelos y una membrana celular que cuenta con receptores celulares y proteínas además de un pequeño depósito llamado acrosoma que contiene enzimas

hidrolíticas.

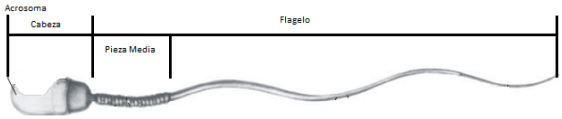

Figura 4: Partes de un espermatozoide.

Para entender el efecto que produce el xenón en los espermatozoides es necesario conocer cómo es que estas células producen su movimiento. El elemento que confiere movimiento a los espermatozoides es el flagelo, que cuenta además con una región próxima a la cabeza conocida como pieza media, que en su interior cuenta con mitocondrias que proporcionan parte de las necesidades energéticas de la célula.

La estructura interior del flagelo conocida como axonema o estructura 9+2, esta compuesto por un arreglo de 2 pares de microtúbulos centrales rodeados por otros nueve pares más distribuidos a su alrededor conectados por la proteína nexina que confiere estabilidad estructural.

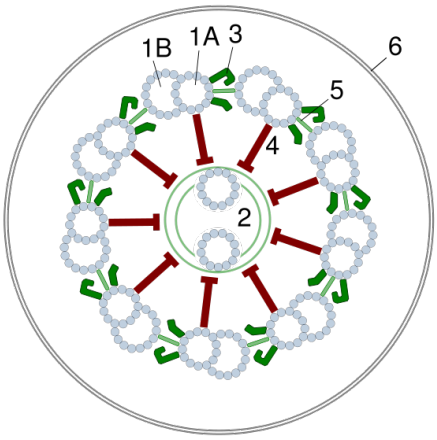

Figura 5: Descripción de un axonema: 1. Par de microtúbulos exteriores, 2. Par de microtúbulos centrales, 3. Brazos de dineina, 4. Radio, 5. Puente de nexina 6. Membrana plasmática

Cada uno de estos pares de microtúbulos contiene un microtúbulo con dineinas, estas proteínas se contraen debido a la fosforilazón de ATP, lo que a su vez mueve los microtúbulos, efecto que a gran escala produce el movimiento de la célula.

En el año 2001 fueron descubiertos dos canales de calcio en espermatozoides maduros, llamados CatSper[22] y CatSper2[23]. Estos canales están relacionados en la motilidad celular en la cual el calcio juega un papel muy importante.

Es conocido el efecto de algunas drogas como la quindina, procainamida, la mexiletina y diltiazem de reducir la motilidad de los espermatozoides[24]. Se cree que el efecto del diltiazem es debido al bloqueo que ejerce en los canales de calcio de los espermatozoides[25]. Por el contrario, algunas drogas como la cafeína estimulan el movimiento de los espermatozoides[26].

Está reportada la presencia de receptores NMDA (NR2B) en la pieza media del flagelo de los espermatozoides de ratón y humano [27]. De interaccionar el xenón con estos receptores podría cambiar la permeabilidad del Ca^{2+}, lo que disminuiría la motilidad de los espermatozoides.

En el presente trabajo se propone estudiar el efecto del xenón en los espermatozoides de ratón ante condiciones de estrés prolongado durante 17 horas (estrés debido a la disminución de un suministro de glucosa y una temperatura constante de 25ºC que es superior a la temperatura óptima en la motilidad de los espermatozoides de ratón de 10ºC [26]).

Para estudiar la interacción del xenón es registrada la motilidad de los espermatozoides como una medida del estado de las células a través de un sistema láser tal como el utilizado en [26].

2. Objetivos

2.1. *Objetivo general*

Estudiar el efecto del xenón en los espermatozoides por medio de la evolución temporal de la motilidad.

2.2. *Objetivos particulares*

- Estudiar la evolución temporal de la motilidad de los espermatozoides a presión atmosférica.
- Estudiar la evolución temporal de la motilidad de los espermatozoides ante la presión hidrostática producida por N_2 a 12 atmósferas y una temperatura de 25°C.
- Estudiar la evolución temporal de la motilidad de los espermatozoides ante la presión hidrostática ejercida por xenón a 10 y 12 atmósferas a una temperatura de 25°C.

3. Metodología

3.1. Aspectos técnicos

3.1.1. Obtención de los espermatozoides

Los espermatozoide son obtenidos de ratones de 6 semanas de edad de la cepa CD1, los cuales son sacrificados por fractura cervical. Posteriormente son extraídos ambos epidídimos y depositados en un tubo eppendorf previamente llenado con 1 mL de solución WH (Whitten-Hepes: 135mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgSO_4$, 10mM HEPES, 10mM glucosa y 1mM piruvato de sodio, a pH 7.3 (NaOH)). Una vez que ambos epididímos se encuentren en la solución son cortados para liberar en el medio a los espermatozoides, la solución final obtenida es de color opaco y contiene tejido y espermatozoides, adicionalmente es agregado 1 mL de solución WH, posteriormente es dejada reposar la solución por 30 minutos. Transcurrido este periodo son retirados 1.5 mL de la parte superior de la solución y depositado en un nuevo tubo eppendorf con 1.5 μL de Penstrep (producto de penicilina y estreptomicina), la solución final es homogeneizada utilizando una micropipeta antes de ser colocados 200μL de esta solución en cada uno de los reservorios del porta muestras.

Figura 6: Portamuestras diseñado para trabajar con gas a presión, consta de una parte de aluminio y una tapa en el fondo hecha de acrílico

3.2. Arreglo experimental

El arreglo experimental consiste de una cámara de metal que alberga un porta muestras que es mantenido a una temperatura constante por medio de un sistema de bombeo de agua. La cámara cuenta con dos válvulas para introducir gas en su interior y dos tapas de acrílico diseñadas para trabajar a altas presiones así como para reducir la cantidad de gas utilizado, lo que permite economizar el gasto de xenón en los experimentos.

Para iluminar las muestras es utilizado un láser de 495mW de una longitud de onda de 550-1064 nm. Para aumentar el tamaño del spot del láser es colocada una lente en el emisor del láser y es montado a 8 metros de la cámara. Para hacer incidir la luz proveniente del láser es utilizado un espejo posicionado justo bajo la tapa inferior de la cámara.

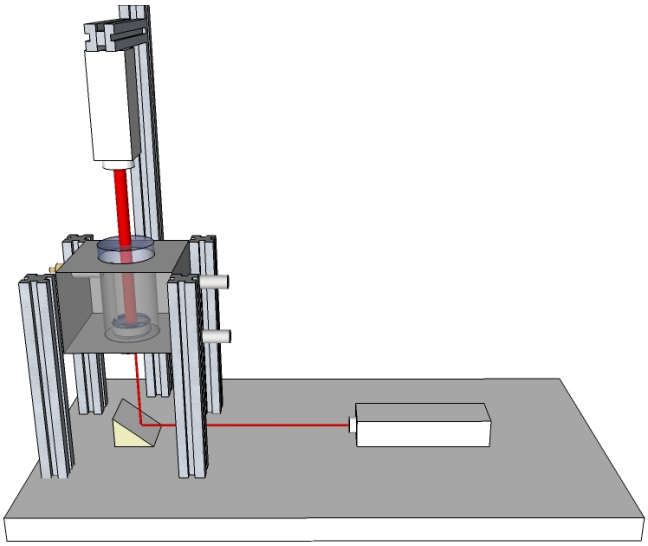

Figura 7: Arreglo experimental.

Para registrar la luz del láser que pasa a través de las muestras es utilizada una cámara digital PL-B742U de la marca Pixelink, de 1.3 megapixeles. La cámara digital se encuentra montada por encima de la tapa superior de la cámara y esta conectada a

una computadora que almacena las imágenes.

3.3. Software

3.3.1. Captura de imágenes

Debido a que las mediciones son realizadas por un largo periodo de tiempo (hasta 17 horas) fue creado un programa que se comunica con la cámara digital y captura las imágenes. El programa fue escrito en C++ y graba las imágenes por grupos en periodos de 3 minutos durante cada hora. Las imágenes son tomadas con 1 segundo de diferencia entre cada captura. Cada grupo de mediciones es grabado en carpetas para separar cada medición de forma secuencial para su posterior análisis.

3.3.2. Análisis de las imágenes

Para el análisis de las imágenes fue creado un programa en Matlab que de manera automática analiza cada grupo de imágenes registrado. Cada imagen registra la luz proveniente del láser al pasar por cada una de las 6 muestras en forma de ruido Speckle. El programa analiza cada muestra por separado de cada imagen mediante una autocorrelación temporal:

$$c_I(t_0, t) = \frac{1}{\beta} \frac{< I(t_0) I(t_0 + 1) >_{X,Y}}{< I(t_0) >_{X,Y} < I(t_0 + 1) >_{X,Y}} \tag{1}$$

Donde β es un factor de normalización calculado a partir de la autocorrelación temporal de I(t_0) consigo mismo. I_0 es la intensidad promedio en el tiempo t_0, esto es, la suma de todos los elementos de la matrix I(X,Y, t_0) promediado sobre el área de la región.

La curva de autocorrelación C_I nos da un valor entre 0 y 1, donde 1 corresponde a células sin motilidad y valores inferiores a 1 corresponden a motilidades cada vez mayores hasta 0 que corresponde a la máxima motilidad.

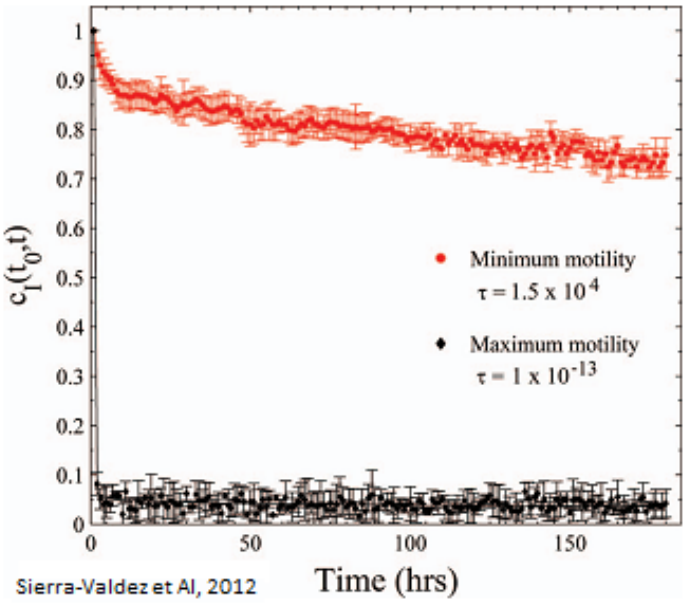

Figura 8: Curvas de autocorrelación (C_I) de dos muestras de espermatozoides. La curva roja corresponde a espermatozoides que murieron por la adición de azida de sodio en el medio. La curva negra corresponde a una población de espermatozoides en plenas condiciones de movimiento[26].

A partir de la curva de autocorrelación obtenida de cada muestra es ajustada una exponencial estrecha y de esta manera se obtiene el parámetro de motilidad (τ):

$$c_I(t_0, t) = e^{-(t/\tau)^{\alpha}} \tag{2}$$

Donde α es un parámetro con valores entre 0.05 a 0.3. Las mediciones de motilidad (τ) de cada muestra son guardados en un archivo de texto para posteriormente ser interpretados.

3.4. Grupos experimentales

3.4.1. Temperatura constante de 25 °C

Para reducir el tiempo de las mediciones y para evitar la formación de hielo en las muestras al trabajar a presiones por encima de 1 atmósfera, se optó por utilizar una temperatura constante de 25 °C, de esta manera acortamos el tiempo de vida de los espermatozoides al no encontrase a la temperatura óptima reportada(10 °C [26]). Antes de realizar cualquier medición el porta muestras fue dejado dentro de la cámara cerrada durante 2 horas para que estuviera a la misma temperatura. Las mediciones fueron realizadas cada hora, tomando la primera medición 1 hora después de haber colocado el porta muestras.

3.4.2. Efecto del xenón a 12 atmósferas

Debido a que el xenón es hidrofóbico es necesario introducirlo a presión para que llegue hasta los espermatozoides, como primer intento se probo xenón a 12 atmósferas.

Fueron realizados los siguientes grupos de experimentos:

- Espermatozoides de ratón en presencia de xenón a 12 atmósferas (3 ratones).
- Espermatozoides de ratón en presencia de N_2 (3 ratones).
- Grupo control: Espermatozoides a presión atmosférica (3 ratones).

3.4.3. Xenón a 10 atmósferas

Como punto de comparación para estudiar el efecto de la concentración del xenón fueron realizados 3 experimentos a una presión de 10 atmósferas y una temperatura constante de 25ºC.

3.5. Gráficas del parámetro de la motilidad τ por grupo

A partir de la exponencial estrecha (ec. 2) ajustada a cada una de las curvas de autocorrelación de las muestras, es obtenido su parámetro de motilidad (τ). De estos 6 parámetros de motilidad τ es calculado un promedio por hora de cada uno de los tres experimentos y una desviación estándar de estas tres mediciones.

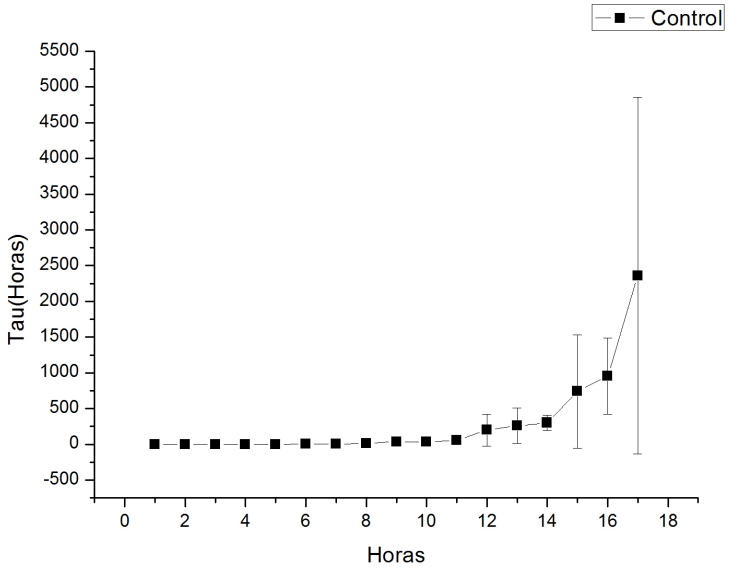

Figura 9: Promedio de los parámetros de motilidad τ de un grupo experimental.

3.6. Ajuste de los datos

Las mediciones de motilidad (τ) de cada muestra comprenden valores por el orden de 10^{-17} para muestras con una motilidad máxima y valores del orden de 10^3 para motilidades mas bajas.

Debido a los problemas de ruido que podrían ser ocasionados por el calentamiento del láser, tanto por trabajar de manera continua por periodos de al menos 17 horas y a las fluctuaciones de temperatura en el cuarto, fue aplicado un filtrado a las mediciones de motilidad con el fin de hacer más notorias las diferencias entre los grupos al reducir

el error en las mediciones. Para esto fue definida una nueva variable, basada en un filtro Butterworth:

$$|F(x)|^2 = \frac{1}{1 + (x/X_c)^{2N}} \tag{3}$$

Donde F corresponde a la respuesta en frecuencia, N es el orden del filtro y Xc a la frecuencia de corte. La elección de los parámetros ($N = \frac{1}{2}, X_c = 1$) fue hecha de tal manera que la curva resultante pudiera ser ajustada a una curva sigmoidea.

Para poder encontrar diferencias entre dos grupos fue introducida una nueva variable, la motilidad máxima (MM):

$$MM = \frac{1}{1 + \tau^3} \tag{4}$$

De esta manera representamos la motilidad en el intervalo comprendido entre 0 y 1. Donde una MM de 1 corresponde a la máxima motilidad de los espermatozoides y 0 a una ausencia de movimiento.

Una vez que es calculada la MM de cada uno de los tres experimentos para cada hora, es calculado un promedio y la desviación estándar.

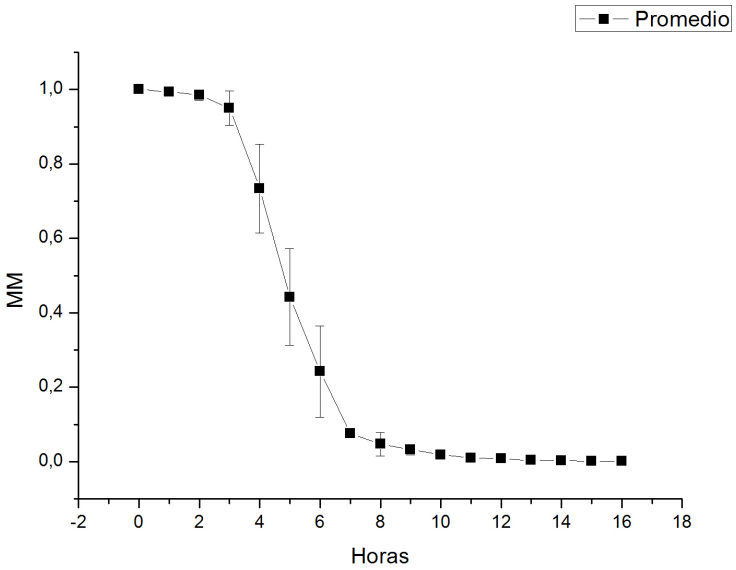

Figura 10: Promedio de la motilidad máxima de un grupo experimental.

4. Resultados

Las mediciones entre los grupos de control y xenón arrojaron una eventual diferencia en la motilidad entre los grupos.

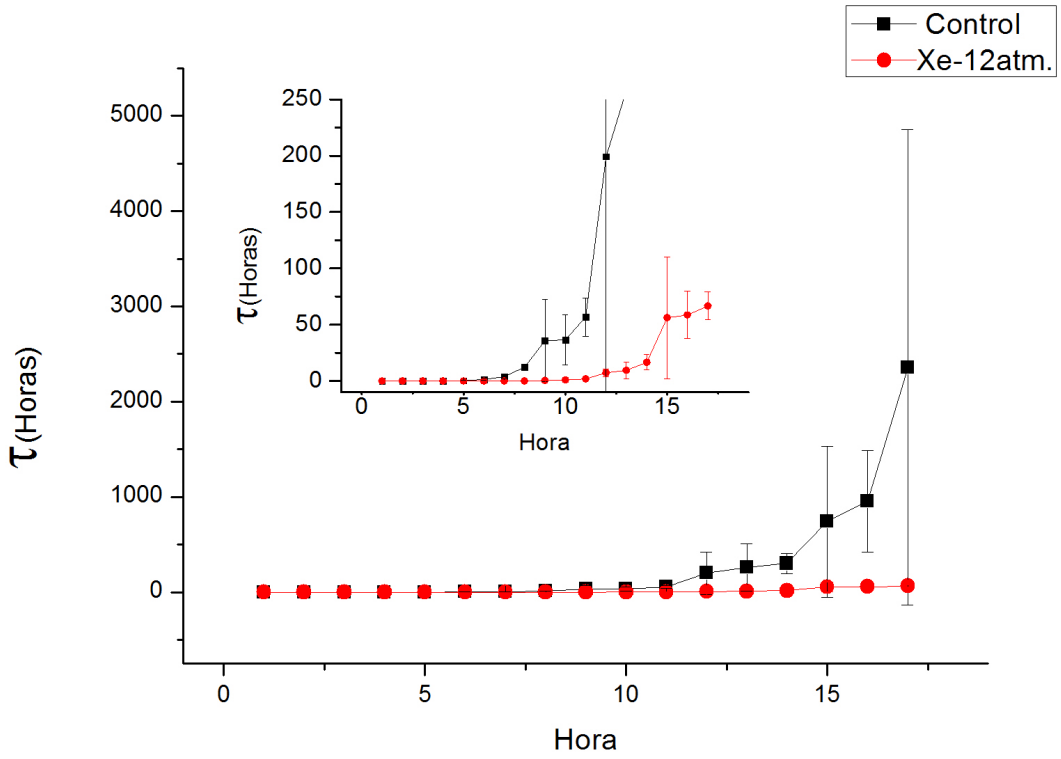

Figura 11: Comparativa del parámetro de motilidad τ de los grupos control y xenón a 12 atmósferas

Debido a que la curva del xenón se encuentra por debajo de la curva control en la figura 11 podemos inferir que no ocurrió un efecto anestésico del xenón en los espermatozoides de ratón a 12 atmósferas. Es interesante señalar que comenzó a aparecer una variabilidad en el grupo control y el grupo nitrógeno que fue más notoria con el tiempo, variabilidad que no se presentó en ninguno de los experimentos con xenón.

Para remarcar las diferencias entre los grupos experimentales y reducir el ruido se graficó la MM de los grupos experimentales control, nitrógeno y xenón a 10 y 12 atm.

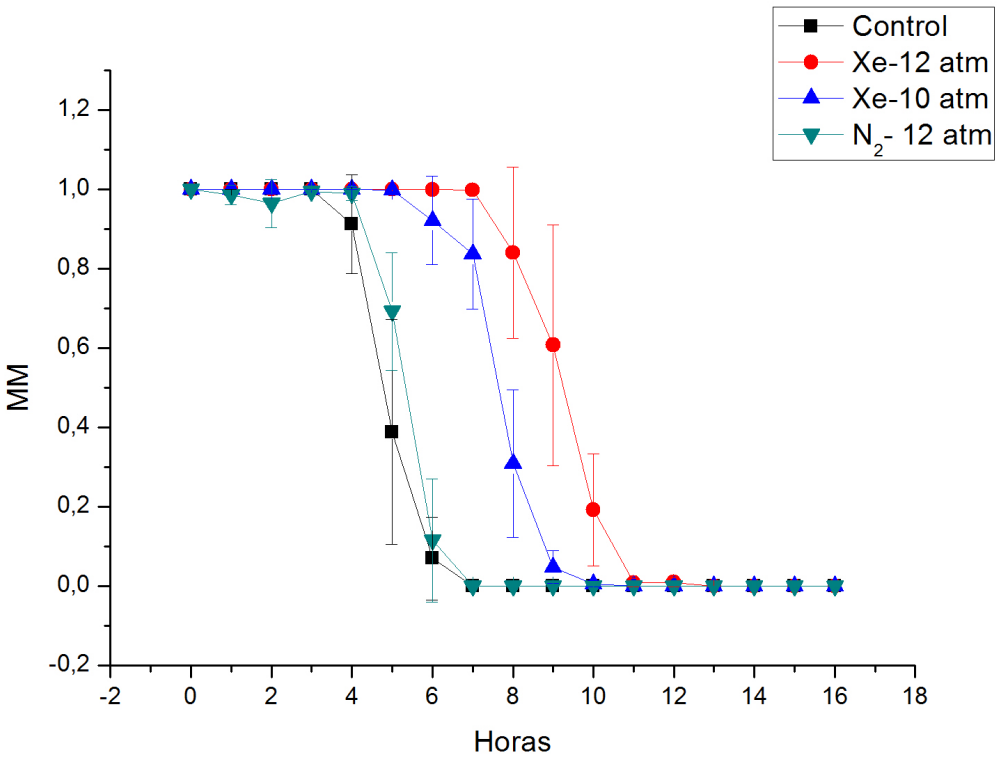

Figura 12: Motilidad máxima.

A partir de la figura 12, la *motilidad máxima*(MM) de las curvas del grupo control y xenón, observamos que, el xenón mantiene a los espermatozoides con la misma motilidad máxima desde el inicio por un mayor tiempo (hasta 7 horas con respecto a la primera medición) a diferencia del grupo control y del grupo nitrógeno en donde los espermatozoide se mantienen con la máxima motilidad solo tres horas después de la primera medición. Es interesante señalar que a las 9 horas el grupo con xenón a 12 atmósferas conserva en promedio casi el 60 % de la motilidad máxima mientras que para el grupo control hay una ausencia total de movimiento. La curva del grupo con nitrógeno a 12 atmósferas muestra un comportamiento similar al grupo control, por lo que descartamos que las diferencias entre el grupo xenón a 12 atmósferas y el control

se deban a la presión. No se descarta que ante presiones mayores ocurra eventualmente un daño y pérdida de motilidad de las células.

A partir de la diferencia entre las curvas de xenón a 10 y a 12 atmósferas inferimos que el efecto depende de la concentración de xenón, esto podría deberse a la naturaleza hidrofóbica del xenón, que al estar dentro de la cámara a una menor presión entra en menor cantidad a los espermatozoides.

Los resultados sugieren que los espermatozoides en presencia del xenón se mantienen en el mismo estado óptimo por un mayor tiempo.

Descartamos la reversión de un efecto anestésico debido a la presión utilizada al introducir el xenón en las células debido al rango de presiones reportados para otros anestésicos generales que son superiores a las 100 atmósferas [19][20].

5. Discusión

Es interesante resaltar que contrario al efecto reportado de una depresión en el metabolismo de la glucosa en el cerebro debido al xenón [16], encontramos que los espermatozoides continúan moviéndose aun en presencia de este gas inerte, proceso que requiere del metabolismo de la glucosa para la producción de ATP. A partir de los resultados encontrados en este trabajo, especulamos que este efecto pudiera ocurrir en un menor grado debido a la interacción del xenón con los fosfolipidos de las membranas[18] de estas células. Lo anterior se podría explicar considerando un cambio en la permeabilidad de iones y glucosa necesarios en el metabolismo de los espermatozoides, lo que visto desde el punto de vista termodinámico significaría un menor incremento a la entropía de las células. Desde un punto de vista biológico esto significaría una menor producción de radicales libres y productos de deshecho del metabolismo que provocan el daño celular, explicando así por qué los espermatozoides se encuentran en mejores condiciones por un periodo mayor de tiempo.

Como complemento a este trabajo podría llevarse a cabo un estudio que tome en cuenta el gasto de glucosa por parte de los espermatozoides en presencia del xenón, experimento que podría realizarse midiendo los cambios en la concentración extracelular de la glucosa mediante el reactivo ácido dinitrosalicilico[28].

Otra posible explicación a este efecto podría encontrarse en el precondicionamiento farmacológico por xenón reportado en corazones de rata [15], donde se encontró que la activación de $PKC - \epsilon$, y uno de sus blancos secundarios p38 MAPK, juegan un papel importante. Así, un estudio con los inhibidores utilizados en dicho trabajo arrojaría pistas para tratar de elucidar el efecto del xenón en los espermatozoides de ratón.

Un estudio de la viabilidad de las células usando yoduro de propidio arrojaría una relación cuantitativa del número de células vivas y muertas en presencia del xenón, experimento que podría ser llevado a cabo en un microscopio de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

6. Conclusiones

- En este trabajo encontramos que el xenón a una presión de 12 atm. ayuda a los espermatozoides de ratón a mantenerse en movimiento por un mayor tiempo (hasta 7 horas) a pesar de estar bajo condiciones de estrés poco óptimas para el movimiento de estas células.

- Este hallazgo podría dar pie a futuros estudios sobre la interacción que este gas ejerce en los espermatozoides a nivel molecular lo que podría ayudar al diseño de nuevos fármacos que imiten funciones específicas del xenón .

- Los resultados de este trabajo podrían servir además para mejorar las condiciones de preservación de esperma para fines de fertilización in vitro.

Referencias

[1] Goodman y Gilman,"Las bases farmacológicas de la terapéutica", *Mc Graw Hill*, 11 ed., pp.341, 2006.

[2] B.W. Urban,"The Site of Anesthetic Action", *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 182, pp.3-4, 2008.

[3] Benno P. Schoenborn, Herman C. Watson, John C. Kendrew,"Binding of Xenon to Sperm Whale Myoglobin", *Nature* , Vol. 207, pp.28-30, 1956.

[4] Paul Banks, Nicholas P. Franks, Robert Dickinson , Competitive Inhibition at the Glycine Site of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Mediates Xenon Neuroprotection against Hypoxia-Ischemia", *The Journal of American Society of Anesthesiologists, Inc.*,Vol. 112, No. 3, pp. 614-622. Marzo 2010.

[5] Stuart C. Cullen and Erwin G. Gross, "The Anesthetic Properties of Xenon in Animals and Human Beings, with Additional Observations on Krypton", *Science*, Vol.113, pp. 580-582, 1951.

[6] N. P. Franks, R. Dickinson, S. L. M. de Sousa, A. C. Hall, W. R. Lieb, "How does xenon produce anaesthesia?", *Nature*,Vol. 396, pp. 324, 26 Nov. 1998.

[7] Henry U. Weigt, Karl J. Fohr, Michael Georgieff, Eva M. Georgieff, Uwe Senftleben, and Oliver Adolph,"Xenon blocks AMPA and NMDA receptor channels by different mechanisms", *Acta neurobiologiae experimentalis*, Vol. 69, pp.429?440, 2009.

[8] Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, Mehmet H, Edwards AD, Franks NP, Maze M.,"Xenon and Hypotermia Combine to Provide Neuroprotection from Neonatal Asphyxia", *American Neurological Association*, Vol. 58, pp.182-193, 2005.

[9] Jonathan E. Walker,"Glutamate, Gaba and CNS Disease: A Review", *Neurochemical Research*, Vol.8,No.4,1983.

[10] Simone Molz, Helena Decker, Tharine Dal-Cim, Carla Cremonez, Fabiano M. Cordova, Rodrigo B. Leal, Carla I. Tasca,"Glutamate-induced Toxicity in Hippocampal Slices Involves Apoptotic Features and $p38^{MAPK}$ Signaling", *Neurochemical Reseach*, Vol. 33, pp.27-36, 2008.

[11] K.K. Jain,"The Handbook of Neuroprotection", *Springer Science+Business Media*, pp.1, 2011.

[12] Pamela Sun, Jianteng Gu, Mervyn Maze, and Daqing Ma,"Is xenon a future neuroprotectant?", *Revista*, Vol. 4, No. 4 , pp 483-492, Jul. 2009

[13] Albers GW, Clark WM, Atkinson RP, Madden K, Data JL, Whitehouse MJ.,"Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke.", *Stroke*, Vol. 30, pp. 508-513, 1999.

[14] Robert L Arias, J.Rene P Tasse, Mark R Bowlby,"Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia", *Brain Research*, Vol. 816, pp.299-308, Enero 23 1999.

[15] Nina C Weber, Octavian Toma, Jessica I Wolter, Detlef Obal, Jost Müllenheim, Benedikt Preckel, Wolfgang Schlack,"Titulo", *The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-ϵ and p38 MAPK*, Vol. 144, Cap. 1, pp. 123–132, Ene. 2005

[16] Rex, Steffen, Schaefer, Wolfgang, Meyer, Philipp H., Rossaint, Rolf, Boy, Christian, Setani, Keyvan, Bull, Ulrich, Baumert, Jan H.,"Positron Emission Tomography Study of Regional Cerebral Metabolism during General Anesthesia with Xenon in Humans", *The Journal of American Society of Anesthesiologists, Inc.*, Vol. 105 Cap. 5, pp 936-943,Nov. 2006

[17] Hammer RP Jr, Herkenham M.,"Altered metabolic activity in the cerebral cortex of rats exposed to ketamine.", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 220(4), pp. 396-404, 1983 Nov 10

[18] Autores,"Diffusive Nature of xenon Anesthetic Changes Properties of a Lipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulations", *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 116, Cap. 30, pp 8989–8995, 2012.

[19] Johnson, F. H., Flagler, E. A.,"Hydrostatic Pressure Reversal ofNarcosis in Tadpoles", *Science*, Vol. 112, pp.91-99, 1950.

[20] Miller, K. W., Paton, W. D. M., Smith, R. A., Smith, E. B.,"The Pressure Reversal of General Anesthesia and the Critical Volume Hypothesis", *Molecular Pharmacology*, Vol.9, pp. 131-143, 1973

[21] Bovill JG.,"Inhalation Anaesthesia: From Diethyl Ether to Xenon", *Handbook of experimental pharmacology*, pp.135, 2008;.

[22] Ren D., Navarro B., Perez G.,"A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility", *Nature*, Vol. 413, pp.603-609, 2001

[23] Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL.,"A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, Vol. 98 No.22, pp.12527-31, 2001.

[24] C.Y. Hong, B.N. Chiang,"Local anaesthetic effect of antiarrhythmic drugs and human sperm immobilization: mechanism and application of the interrelationship.", *British Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 17, pp.687-690, 1984.

[25] Barbara L. Wood, Gustavo F. Doncel, Pingili R. Reddy, David C. Sokal,"Effect of diltiazem and methylene blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration: potential use as vas irrigants at the time of vasectomy", *Revista*, Vol. 67, pp.241-245, 2003.

[26] F. J. Sierra-Valdez, A. J. Cisneros-Mejorado, D. P. Sánchez Herrera, and J. C. Ruiz-Suárez,"A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation", *Review of Scienfic Instruments*, Vol. 83, 2012.

[27] Hu JH, Yang N, Ma YH, Jiang J, Zhang JF, Fei J, Guo LH.,"Identification of Glutamate Receptors and Transporters in Mouse and Human Sperm", *Journal of andrology*, Vol. 25 no.1, pp.140-146, 2004.

[28] G.L Miller,"Use of DinitrosaIicyIic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar ", *Analytical Chemestry*, Vol. 31, No. 3, pp.426-428, 1959.