



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Causa de las anomalías morfológicas de los espermatozoides del ratón nulo  
para SLO3

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
AURA DEL ANGEL ANDRADE ORLOFF

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ  
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Hilda Maria Lomeli Buyoli (Instituto de Biotecnología, UNAM)  
Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (Instituto de Biotecnología, UNAM)  
Dra. Celia Santi Grau Pérez (Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas)

Cuernavaca, Morelos. **Julio**, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se llevó a cabo en el Consorcio de la Fisiología del  
Espermatozoide

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

1. Datos del alumno  
Aura del Angel  
Andrade  
Orloff  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Posgrado en Ciencias Bioquímicas  
Instituto de Biotecnología  
407010893

2. Datos del tutor  
Dra.  
Claudia Lydia  
Treviño  
Santa Cruz

3. Datos del sinodal 1 (Presidente)

**Dr. José Luis Puente García**

4. Datos del sinodal 2 (Secretario)

**Dra. Denhi Schnabel Peraza**

5. Datos del sinodal 3 (Vocal)

**Dr. Enrique Othon Hernández González**

6. Datos del sinodal 4 (Vocal)

**Dra. Helena Porta Ducoing**

7. Datos del sinodal 5 (Vocal)

**Dr. Adan Oswaldo Guerrero Cardenas**

8. Datos del Comité Tutor

**Dra. Hilda Maria Lomeli Buyoli**

**Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay**

**Dra. Celia Santi Grau Pérez (Tutor Invitado)**

9. Datos del trabajo escrito

Causa de las anomalías morfológicas de los espermatozoides del ratón  $Slo3^{-/-}$

65 p.  
201

***Gracias al ser, a la existencia, a la naturaleza, al cosmos, al universo...***

***Al gran misterio...***

***A la realidad con todos los planos que contiene.***

***Musa de nuestras ficciones y sueños...***

***destinada siempre a superarlos con sus realidades...***



## **Agradecimientos:**

**Al CONACyT por el apoyo económico gracias al cual pude subsistir con mi proyecto durante cierto trayecto de la maestría.**

**Al IBt, por mostrarme las sorprendentes facetas de los quehaceres de la ciencia institucionalizada.**

**A todos los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, por sus consejos, enriquecedora retroalimentación, compañía y por sus enseñanzas en los procesos de la maestría.**

**A Antonio Bolaños Guillen y Gloria Villa Herrera**, por apoyarme con entusiasmo incondicional, paciencia, tranquilidad y sonrisas durante todos los procesos burocráticos necesarios para sobrevivir el posgrado. Son el eje, imperceptible para algunos, que permite que la maquinaria del IBt continúe graduando alumnos y por ende, funcionando.

**Al Dr. Alberto Darszon**, por todo su apoyo indirecto y por ser un ejemplo, una sugerencia silenciosa, bastante inspiradora, de cómo debe ser un hombre de ciencia.

A mi tutora la **Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**, por su apoyo, comprensión, tolerancia, paciencia, enseñanzas, por su amistad invaluable y por su personalidad perfeccionista y cálida sin la cual este trabajo hubiese sido imposible.

A mis primeros maestros **Julio Chávez y José Luis de la Vega**, por enseñarme con amabilidad y paciencia las bases técnicas que sostuvieron todo el desarrollo experimental de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio del **Dr. Salkoff** y de la **Dra. Santi**, gracias **Gonzalo, Valentina, Antonia, Alice...** gracias por recibirme y regalarme su tiempo, paciente enseñanza, apoyo constante y sobre todo, su amistad.

A **Marcela Ramírez Yarza**, por compartir con la mejor disposición su tiempo, su espacio, sus consejos, su entusiasmo, su cálida amistad, maternidad y su sabiduría invaluable, teoría elegantemente puesta en práctica. Gracias por apoyarme con tu profunda experiencia y por enseñarme todas las cuestiones que me permitieron mantener la colonia de ratones Slo3<sup>-/-</sup> en el bioterio del IBt.

A **Paulina Torres**, por su cálido apoyo en los experimentos de citometría de flujo, por su compañía risueña, su charla, su empatía, sus risas y su hermoso corazón. Gracias por sacar siempre lo mejor de mí en los experimentos... sin tu tutoría y amistad, esta tesis no hubiese sido posible, mi querida amiga.

Gracias, **Fabio Herrera**, por aceptar ser el heredero del proyecto, gracias a tu compañía y apoyo pude mantenerme a flote en los últimos momentos de la maestría. Gracias por darme la oportunidad de compartirme lo poco que sé y tenderme tus palmas con plena confianza para sostener un proyecto que me toca dejar atrás.

A todos los miembros de mi comité tutorial y del jurado, por sus comentarios, observaciones, sugerencias, tiempo y apoyo. Gracias por ayudarme a construir esta tesis y cerrar adecuadamente el ciclo de la maestría.

Al huerto de la UAEM ("Las Lechugas") y el Huerto de Lucía por nutrir mi cuerpo y mi alma.

## Agradecimientos personales,

Es difícil lograr cubrir en pocos renglones los infinitos agradecimientos que tengo para cada una de las tan especiales personas que me permitieron lograr concluir la senda de la maestría, este ciclo tan importante que definitivamente dejó abisales experiencias y una grande cicatriz, huella profunda, en mi vida.... Así que intentaré ser breve... y no agotar más que un par de hojas y una pizca de más, además de evitar la palabra “maestro”, “maestra” tanto como pueda... pues en esta travesía todos fueron unos grandes maestros, incluso aquellas entidades que no mencioné por distracción, privacidad, falta de espacio etc.

- ∞ En primer lugar, te agradezco profundamente, amada, increíble, súpertutora y amiga, **Dra. Claudia Treviño**: Te debo incontables libertades espirituales, intelectuales, físicas. Te agradezco la oportunidad que me regalaste de corazón, la bella oportunidad de viajar y reconciliarme con mi origen, en un sentido más extenso que la reunión maternal. Te debo la oportunidad de haber podido profundizar en la ciencia como nunca creí llegar a hacer, descendiendo a infiernos reduccionistas desde los cuales pude apreciar con perspectiva inigualable cielos holísticos y aquello que palpita y me llama más allá de lo *in vitro*. Te agradezco Claudia por regalarme siempre tu dulzura, tolerancia y confianza, a pesar de los momentos tortuosos y amargos... esos momentos en los que tenías que soltar un latigazo amoroso para que las criaturas de disciplina y compromiso ganaran la batalla sobre la niebla de la renuncia y apatía que nublaba la dirección propuesta. Te doy gracias y un silencio honroso, soy quien soy gracias a los andares que me propusiste, gracias a la senda que me señalaste y gracias a tus palabras de aliento cuando sentí la carrera perdida, gracias a ti viví la experiencia de que la verdadera libertad se gana a base de disciplina y constancia. Como dirían los navajo “no hay que dejar nudos atados en el cordel de la vida” y tu me ayudaste a evitar un gran nudo, gracias a ti logré cumplir un fuerte deber, librar la batalla de mi Arjuna interno y salir victoriosa...eres la piedra angular que me permitió consumir la maestría, ojalá mi gratitud pudiese ser mejor retratada con palabras.
- ∞ **Miguel Andrade**, padre amado. Te agradezco por inspirarme con tu paciencia profunda, con tu amor incondicional, ese que le regalas discretamente y sin escatimar a tus hijas e hijos, siguiendo la filosofía de que “todo es mejor en el anonimato”. Gracias por todas las formas en las que nos das apoyo y gracias a aquello que lo mueve en las profundidades de tu espíritu. Gracias a tus inolvidables consejos con capeado metafórico, esos que te sacabas de la manga mientras manejabas conmigo de lunático copiloto... no olvidaré ese “uno tiene que terminar de surfear la ola que atrapó, si no quiere que le caiga encima y lo aplaste” o ese al que incluso ensalzaste con performance al tomar una curva pronunciada “es como una curva Aura, no frenas en ella, utilizas la velocidad que ya tienes y frenas con motor para sobrepasarla tranquilamente”, o esas palabras que me lanzaste cual certero rayo “¡Tienes que aprender a ser tolerante, en especial contigo misma!”. Gracias por ser ese padre maternal, flexible, paciente, ese tlacuachito apapachador dispuesto a cargar a sus críos aunque ya pesen lo mismo o más que él. Infinita gratitud por tu humildad, tus silencios, tu capacidad de escuchar y aguantar ese papel que te regalé forzosamente durante toda la maestría, ese papel de víctima de mis tenebrosos monólogos develados, proyecciones de mis desesperaciones súbitas ante la ilusión de encierro que me conquistaba, cual ratón de bioterio afectado por estereotipias.
- ∞ Gracias **Maruchi**, por ser ese aliento de esperanza... esa alada criatura translúcida que aguantó contemplar el teatro de la vida con sus ojitos pícaros incrustados en mi personaje, soportando el palpitante manojo de nervios durante toda la obra. Forrada de encajes, seda y terciopelo, sentadita en la polvorienta y añeja esquina fúngica de la caja de Pandora, meditando tras la regurgitación de sombras desencadenada por su apertura. Fuiste aquella vocecita que como AURYN musicalizado me susurró al oído: “Haz lo que quieras”. Esas palabras me dieron confianza para seguir adelante con el supuesto deber, confiando en que a lo lejos y al concluir lo pactado, existía una luz de libertad, que al principio imaginaba, pero luego se hizo real y que no hubiese recibido de no haber atravesado esta senda. Te agradezco, dama querida, por tu papel de testigo silencioso, paciente, siempre amorosa al lado de la también silenciosa víctima de mis monólogos develados... siempre atenta a las aventuras que me acontecían y siempre dispuesta a compartir todo, incluso mis locuras. Gracias sangre de mi sangre fantástica, sigamos compartiendo libertad y magia.
- ∞ Gracias **Carol**, amada esporita de mi alma... qué te puedo decir... para mí siempre serás un oasis en el desierto. Un salto hanumanesco, poderosa monita ninja, desde la sombra de un ardiente mezquital a la caladora fresca de una turquesa poza surrealista. Fuiste una antorcha celeste, un lucero en el IBt, la estrella polar de la constelación que alumbraba las más oscuras sendas de la maestría. Y más allá de todo esto, eres mi hermana de vida, compañera de danzas, andanzas, vagancias,

extravagancias... mi amada Carol, tanto que recorrer hombro a hombro, tú conoces los mágicos secretos y las místicas solemnidades en las cuales puede desembocar la aparentemente burlesca mueca de un pacto mano a mano sellado con saliva seca, gracias por recorrer esas sendas inesperadas conmigo, sendas a las cuales sólo llegas a través de la fe y la entrega incondicional al devenir, al azar, al destino, sendas en las que los compañeros, a veces efímeros, siempre son benditos portadores de bendiciones ... que nuestros andares siempre ondulen hacia nodos en común, y que tras el contacto, nuestras amplitudes se extiendan tendiendo al infinito. Coautora del primer, perfecto, gel de genotipificaciones... ese cuya sudorosa, noctámbula, producción concluimos con un paseo felino al alba, pupila con pupila, cola a cola con Mezcalina, seguidas por los vapores de un chocolatito caliente que no habríamos de sorber completamente. Te dedico esta tesis con una infinita gratitud fraternal, Carol, maestra de maestras.

- ∞ Gracias a todo el **Clan Piña**, mi familia, mis tepachitos amados: Rafa, Deneb, Sandra, Ivi, Gabriel, Trufa, Conga, Mariana, Atila, Nicole, Doddoli, Coral, Carol y los que me falta mencionar, gracias por compartir todo lo que trajo la maestría: frustraciones, burlas, alegrías, miedos, berrinches, estreses, llantos, gritos, pataleos, chistes, dramas, orgullos, silencios, etc... Gracias por sus sonrisas, consejos, por prestar oídos, brazos, hombros para llorar, palmaditas para animar, gracias por todo su amor fraternal, por reirse de mí y conmigo... por compartir esos esporádicos desayunos familiares tan renovadores. Y gracias al siempre alegre, dionisiaco anfitrión, nuestro adorado sabio, esférico pastor de los paralelepipedos: **Elías**... gracias por haberme adoptado, por haber establecido lazos tan hermosos tanto conmigo como con toda mi familia. Gracias Elías, Zorro Plateado, por tus consejos, tus discursos, tu ejemplo, eres una gran inspiración y es invaluable tenerte a ti y al Zorro Negro como sabios de las tribus que se han fusionado durante todo el peregrinar académico.
- ∞ **Arturo**, amado Zuricatisho Xerófilo. Gracias por todos estos años de ternura, amistad, cariño y cuidados, de mágicas experiencias súbitas. Te agradezco la calidez de tu excéntrica y apacible madriguera, cuya puerta siempre abriste de par en par, igual que tu excéntrico y enorme corazón, dando cobijo a mi nomadismo crónico. Gracias también por presentarme y compartir a tu fabulosa, hermosa y fantástica familia. Gracias por ser testigo de toda mi formación científica... desde que llegué en pañales contruidos por románticos ideales al IBt, hasta ahora, que salgo cargando en el bolsillo izquierdo del saco institucional, la prenda zurrada dentro de una bolsa hermética y compactada. Gracias por soñar conmigo con las simplezas de una vida cínica en el sentido del sabio Diógenes, gracias por ser tan admirable, tan trabajador, tan inteligente, tan dedicado, me inspiras con tu presencia y con tu ausencia, siempre que invoco tu imagen. Gracias por soñar con sueños similares, aumentando el combustible del cohete alternativo al que nos andamos subiendo, gracias por ser tan buen compañero, tan gran amigo... por alentarme a elegir lo menos posible, lo más simple, lo menos procesado, lo más local. Gracias por acompañarme siempre en los sueños que me servían como escape de la maestría y también por servirme de ejemplo para, ya consumado el sueño, volver al camino del deber, para concluirlo.
- ∞ Gracias mis amigas de guayabalandia: **Aura del Fin**, tocaya de mi alma, por todo lo que aprendí y compartí gracias a tu enorme corazón. Gracias por tantas recetas y enseñanzas de vida, gracias por tus espacios, tus palabras, tu sazón. Gracias por los momentos en Huichi, en Atmaram, en la Fonda Veggie, gracias por enseñarme lo que es servir desde el corazón. **Lourdes**: Por tu gentileza, delicadeza, compañía, tiempo, detalles y belleza... gracias por estar ahí en mis frustraciones, locuras, amores, desamores y demás vagancias. **Itzia**, lucero rojo que iluminó las noches de mi maestría; gracias por tu admirable ejemplo, tu fortaleza, tu hermosura, eres una guerrera. Gracias por compartir las aventuras, por entender y resonar al ritmo de los gitanos espirituales. Infinitas gracias por todas las experiencias compartidas, por enseñarme que "estar en el hoyo" en buena compañía, hace que te elevas a apacibles parajes indómitos.
- ∞ **Marité**...Maga lucidélica, bruja plateada, loba alada.... Musa mágica e inspiradora, irrealmente real. Gracias por darme fuerza en esos momentos en los que berrinchuda y con raquitismo espiritual, me tiraba en la alfombra de la vida, retorciéndome y te contaba mis planes de abandonar la maestría. Gracias por tus consejos, por tu amor maternal, ese que al principio me asustaba y tensaba por no saber cómo recibir. Gracias por las atenciones, los oídos que me prestaste siempre, especialmente cuando me empeñaba en resquebrajar el deber académico, plan que siempre lograste extirpar de mi mente con ternura sin igual, recordándome la importancia de no dejar nudos en la vida. Gracias por tu ánimo, por tu proteico amor, por tus ojos de guerrera cariñosa siempre dispuesta a apoyar... por ser la sabia loba de la manada que me señaló la importancia de bajar a todos del pedestal del idealismo y jamás mirar a alguien ni hacia abajo ni hacia arriba. Gracias por albergarme en ese magnífico santuario en el que sembré mi corazón, en el que la magia que tanto buscaba desde la infancia se manifestó ante mí de forma jamás soñada, jamás fantaseada, superando la ficción, como toda

realidad y respirando al ritmo solar de la clorofila. Gracias por tu amistad, por los tabacos, por los rezos, por los chismes, chistes, por tu sabiduría, por las plantas, por tus consejos y por compartir tus aventuras conmigo. Serás para mí, siempre, una inspiración, hermosura encarnada, amada vagamunda dedicada, curandera, mujer medicina, bendita seas siempre, te honro con todo mi espíritu.

- ∞ Mi queridísimo **Pablo**, sabio ser magnético. Gracias por tu pasión y capacidad científica (que más de una vez me dejó boquiabierto, admirada e inspirada), por tu disciplina, por tus ritmos, por la calidad de tu trabajo, que invita a tomarte como ejemplo... Gracias por no dejar las cosas en el puro boceto de la ilusión, si no que construir lo propuesto, inspirando siempre. Gracias por animarme cuando ya veía la maestría como una prueba imposible, por impedir mi caída con ese amor apache de hermano mayor. Gracias por siempre estar consciente del objetivo en una tarea, sosteniendo el timón firmemente a pesar de la luz u oscuridad del panorama circundante. Gracias por tu sorprendente magnetorecepción en la vida, por siempre poder señalarme la dirección de la flecha, el norte, el sur... todas las direcciones con sus posibilidades y gracias por esos escapes míticos, esos viajes intensos en los que de manera misteriosa, volvíamos a casa justo en el momento acordado. Eres un gran capitán, un gran líder, es un honor estar a tu lado en la vida, hombro a hombro, mano a mano... Gracias.
- ∞ Chemanita, amada **Carito**... gracias por tu espontaneidad, por tu magia, por tus cantos, por tus rezos. Gracias por compartir conmigo tu espacio, tus experiencias, familia, andares, pensares... gracias por ser un intenso y libre viento jugueteón, siempre inspirador, siempre trabajador, siempre amoroso. Gracias por cobijarme y consentirme siempre que lo necesité.
- ∞ Gracias a todas las Tribus, a los amigos y amigas, hermanos y hermanas que conocí ahí. Gracias por ayudarme a ver que la vida es una ceremonia y que todos somos familia, por enseñarme el poder de la palabra desde el corazón, el poder de la fe, del rezo... por recordarme que los espíritus y la magia, están en todos lados, sólo hay que abrir los ojos y tener atenta la antena. Gracias por recordarme que, como diría Sveta... lo importante es hacer de la vida un ritual... y por supuesto, disfrutarlo.
- ∞ Te agradezco madre, **Svetlana Orlova**, Anfisa Osinnik, hermosa e inspiradora mujer, poetisa del olvido, colonizadora y conquistadora de los limbos más profundos de nuestra sociedad. Tú fuiste el motor que puso a andar el móvil de la maestría por su carril y yo dentro de él, un poco mareada y conteniendo las náuseas al principio, pero al final, como en un extremo juego de feria, la adrenalina, las subidas y bajadas, las inversiones a toda velocidad valieron la pena, disfruto y honro donde estoy parada aquí y ahora, un poco tambaleante aún pero segura del lugar hacia donde dirigir mis próximos pasos y feliz de poder apreciar un paisaje menos garabateado por las prisas... Gracias madre, la necesidad de reunirme contigo y continuar compartiendo el gran viaje que es esta vida con tu esteparia figura, al menos por breves momentos, fue y siempre será una inspiración, una batería inoxidable que me mantiene en movimiento.
- ∞ Gracias **Bruce Begay Wayne**, por compartir tu hogar, sabiduría, cordialidad, espacio, tradiciones y buenas intenciones con perfecto equilibrio entre flexibilidad y fuerza.... Gracias a ti, al tipi, al fuego purificador, al latir del tambor, al gran jefe sentado en la media luna de la vida, a todos los espíritus no mencionados y a toda la familia que nos ayudó, madre e hija, a contemplar la ceremonia que es la vida y el arduo trabajo físico y espiritual que a veces implica. Gracias por recordarnos siempre el no dejar nudos en la vida y por el rezo con respecto a mis estudios, gracias por orientarnos a fijar un objetivo, una intención, echar raíces ahí donde estamos paradas y extender nuestras ramas hacia los sueños que habremos de tocar y concretar.
- ∞ Gracias mi querido **Alexis**, Príncipe Duende, papalote psiconauta, viajero dimensional, loco y burlesco mensajero de Xochipilli... Gracias por compartir la magia que llega a tus manos conmigo. Gracias por regalarme esos boscosos y florales espacios de olvido y desapego, libres de compromisos y promesas. Esos espacios de erráticos fantaseos acompañados, de perezosa camaradería, de "pura gozadera", de languidez ociosa que produce renovación lúcida de forma inesperada... esos espacios atemporales sazonados por mis prisas súbitas... en los que de pronto, atónita e histérica, experimentaba inesperadamente, el despertar de mi responsabilidad y me arrastraba para buscar un reloj, como ancla que me retornara al mundo de los deberes... y al ver la hora en el aparatejo, fuera la que fuera, salía huyendo de la nave espacial con la tesis en proceso bajo el brazo para continuar trabajando en un lugar menos destornillado... Gracias, de verdad, por la esfera dentro y fuera de la mansión, en ésta pude tener nostálgicas y melancólicas pausas nubladas, donde respirar profundo y adquirir fuerzas para continuar con el camino del asunto prometido. Pero sobre todos esos momentos, y además de tu amistad: Te agradeceré siempre por obsequiarme ese relámpago de "chidez

inexpresable”, esa visión sinestésica. Esa experiencia en la que casi decidí hundir mi barco, derritiendo mi insignificancia ante la presencia del sol que contiene infinitos soles, esa entidad mística que todos llevamos dentro y fuera, aquella que va más allá del bien y el mal, el amor y el odio, la creación y la destrucción, más allá de toda dualidad, aquella que habita en nuestro agujero negro interior, contenedor de la energía eterna, entidad indescriptible que todo conecta, mar de posibilidades que genera ese oleaje, esa danza universal incesante, en donde se juntan aguas de todos los ríos, para descansar, para renacer... también las aguas de tus amores y de los míos.

∞ A la **Cooperativa las Cañadas**, por enseñarme ciencia fuera del tubo, una ciencia minimalista, básica, al alcance del Sol... gracias por iluminarme con sus cursos, sus experiencias, por ser la brújula que me indicó la dirección que tenía que tomar. Por presentarme la permacultura, la agroecología, el cultivo biointensivo, los bosques comestibles, la cacofobia, el síndrome de los tres cochinitos, los ciclos cerrados, la huella ecológica, el pico del petróleo. Gracias por enseñarme teórica y prácticamente tanto, por inspirarme en cada visita y por demostrarme que mi pelea no era con la ciencia per sé, sino que con la cautividad de lo *in vitro* y sus complejas verdades carentes de resiliencia... Infinita gratitud por ayudarme a salir del tubo, invitándome a contemplar los patrones más allá del detalle y a aproximarme al problema directamente en el contexto.

∞ A la ponderosa ciencia del **YOGA** por la unión que es, por todo lo que me ha obsequiado y continua obsequiando. A la comunidad de **Atmaram** y a la primera generación de yoguis y yoguinis que se graduó en este bendecido espacio, uno de mis segundos hogares durante la maestría. Agradezco a toda la familia que conocí en este lugar, a los devis, devas, yoguis y yoguinis. Agradezco profundamente, su compañía enriquecedora, su energía durante la práctica de asana que solía concluir en estabilidad y paz interna. Gracias **NAVE DE ÑOÑOS** por compartir los espacios, reflexivos, expansivos, refrescantes, contemplativos, esos espacios de estudios, risas, simplezas y profundidades en la comodidad de nuestra querida Casa Alejandría, gracias a **Tlaloc y a toda su familia** por ser los generosos guardacasas de ese espacio libertador.

Gracias a todos los que permitieron que el Curso de formación de maestros de Yoga en Atmaram, ocurriera, gracias por esos fines de semana.... Gracias **Bindu, Jim...** por las tareas que me permitieron un autoconocimiento más profundo, gracias **Ulises, Chandesh...** por permitirme canalizar los excesos de energía de una forma creativa que invitaban a respirar profundo y entregarse a la autocontemplación y a la calma. Gracias a todos mis maestros formales e informales, gracias a los frecuentados y a los visitados sólo en una ocasión, gracias a todos aquellos que fomentaron mi disciplina y participaron indirectamente en la conciliación del sueño/pesadilla que fue la maestría. Gracias, de nuevo y por siempre, a todos mis maestros de yoga: Ulises, el que me inició, a Chandesh, a Bindu, Jim y **Christopher Wallis (Hareesh)**, que con sus inspiradores conocimientos y experiencias compartidas enriquecieron y abonaron el suelo donde mi semillita comenzaba a despertar y a estirarse y contraerse, a palpar... a experimentar un spanda universal simplificado hasta la simplicidad humana, como diría Anfisa Osinnik...

Y, finalmente, y desde el más recóndito fondo de mi corazón: Gracias místico ente montaraz aroma palo santo por ser agente catalizador de profundas auto contemplaciones, que me recordaron el valor real y el poder del maestro interno. Gracias por resaltar con cada visita la importancia de la autodisciplina direccionada, la autodestrucción de los excesos y complejidades para avanzar hacia la autoconstrucción minimalista, manteniendo enfoque constante y siendo fiel a la renuncia, al rechazo de torbellinos de pasatiempos vacuos. Gracias por ayudarme a disolver mi mente, por tu energía, por tu fuego purificador, por tu acción, eres un soplo de inspiración que cala profundo y que reaviva en mi corazón una flama multicolor que amenaza con incinerarme en cada encuentro. Espejo que muestra anhelos que atesoro, hermoso y amable mensaje encarnado. Héroe inspirador, que invita a vivir el momento presente con amorosa entrega, apasionada y a la vez desapegada, sin esperar frutos de las acciones e invocando constantemente a la nobleza del silencio. Gracias por todos los consejos contenidos en tus palabras, acciones y silencios. Gracias por ayudarme a rechazar el uso de correas, bozales, jaulas, floreros... y recordarme la importancia de mantener prudente distancia con respecto a los velos engatusadores del ego, esos que te suelen adornar y enceguecer, atándote a la oscuridad del consumismo esotérico y la pseudoespiritualidad. Gracias por darme bocanadas de aire salvaje que refrescaban mi cautiverio, gracias por ayudarme a contemplar con ojos renovados a la divinidad omnipresente: la naturaleza cruda, parsimoniosa, minimalista y salvaje, mi perpetuo santuario, aquello a lo que añoro volver.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>Canales de K<sup>+</sup> de la familia Slo</b> .....	<b>11</b>
<b>Slo3 y su posible papel en la regulación del volumen de los espermatozoides</b> .....	<b>13</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivos generales</b> .....	<b>14</b>
<b>Metodologías</b> .....	<b>15</b>
<b>Manejo de ratones</b> .....	<b>15</b>
<b>Evaluación morfológica</b> .....	<b>15</b>
<b>Pruebas de Movilidad</b> .....	<b>16</b>
<b>Citometría de flujo</b> .....	<b>17</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>19</b>
<b>Estudios de la morfología de espermatozoides</b> .....	<b>19</b>
<i>La BSA altera la morfología de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup></i> .....	<b>19</b>
<i>La Metil-β-Ciclodextrina (M-β-CD) altera la morfología de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup></i> .....	<b>21</b>
<i>La incubación con clofillium 50 μM y quinidina 100 μM sensibiliza o mimetiza la sensibilidad a los espermatozoides Slo3<sup>+/-</sup> al BSA, promoviendo la formación de angulación flagelar y horquillas</i> .....	<b>24</b>
<b>Estudios utilizando citometría de flujo</b> .....	<b>29</b>
<i>Curva de titulación para Ca-AM</i> .....	<b>29</b>
<i>Los cambios morfológicos inducidos por el bloqueo con Clofillium 50 μM y Quinidina 100μM y la posterior adición de BSA no son detectados a través de la citometría de flujo</i> .....	<b>33</b>
<i>Cambios de volumen detectados a través del bloqueo del canal CFTR</i> .....	<b>36</b>
<b>Estudios de motilidad utilizando el sistema CASA</b> .....	<b>39</b>
<i>El ajuste a una osmolalidad de 430 mmol/kg afecta la movilidad de los espermatozoides ...</i> 39	
<i>La hiperpolarización causada por SLO3 favorece el gradiente electroquímico del Ca<sup>2+</sup> y esto es determinante en la transición de la motilidad activada a hiperactivada en los espermatozoides</i> .....	<b>40</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>44</b>
<b>Anormalidades morfológicas en ausencia de SLO3</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>46</b>
<b>Anormalidades morfológicas en espermatozoides del ratón Slo3<sup>-/-</sup></b> .....	<b>46</b>
<b>Estudio morfológicos y volumétricos de los espermatozoides del ratón SLO3<sup>-/-</sup> utilizando citometría de flujo</b> .....	<b>46</b>
<b>Movilidad espermática en el ratón SLO3<sup>-/-</sup></b> .....	<b>46</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>47</b>

ANEXOS.....	52
ANEXO I: SEÑALIZACIÓN DURANTE LA CAPACITACIÓN.....	52

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del espermatozoide maduro y del testículo.....	7
Figura 2. Movilidad de los espermatozoides de mamífero.....	7
Figura 3. Morfología del espermatozoides ante problemas de RDV.....	10
Figura 4. Canales de K <sup>+</sup> de la familia Slo.....	12
Figura 5. Esquema de parámetros de movilidad registrados a través de CASA.....	17
Figura 6. Porcentaje de espermatozoides anormales del raton SLO3 <sup>-/-</sup> tras exponerlos a la BSA y NaHCO <sub>3</sub> .....	20
Figura 7. En ausencia de SLO3, la remoción del colesterol induce la formación de horquillas a través de un proceso independiente del Ca <sup>2+</sup> .....	23
Figura 8. Anormalidades morfológicas inducidas por el BSA en espermatozoides SLO3 <sup>+/-</sup> incubados con bloqueadores de SLO3.....	25
Figura 9. El BSA afectó la morfología de los espermatozoides SLO3 <sup>+/-</sup> tras la incubación por 15-20 minutos con clofillium y quinidina.....	26,27
Figura 10. Curva de titulación para Ca-AM.....	30
Figura 11. Curva de titulación utilizando Ca-AM en presencia de rafinosa.....	31
Figura 12. La presencia de rafinosa afecta la complejidad y el volumen de la población celular.....	32
Figura 13. El bloqueo con clofillium, quinidina y la posterior adición de BSA no afecta la dispersión lateral del láser (FSC) ni la fluorescencia de Ca-AM de la población de espermatozoides SLO3 <sup>+/-</sup> .....	34
Figura 14. La adición de BSA a espermatozoides SLO3 <sup>-/-</sup> no afecta al FSC ni la fluorescencia de Ca-AM de forma significativa.....	35
Figura 15. La inhibición utilizando CFTRinh-172 durante la capacitación no produjo decremento significativo de volumen detectado a través del FSC.....	38
Figura 16. El ajuste con NaCl a 430 mmol/kg afecta la movilidad de los espermatozoides de ratones silvestres y mutantes.....	40
Figura 17. Gráficas de violín de parámetros CASA tras la adición de procaína y timerosal...	42

**Figura 18. Modelo de RDV desencadenado por la activación de SLO3..... 45**



## Resumen

La fecundación en organismos de reproducción sexual consiste en la fusión del espermatozoide y el ovocito, en este proceso participan diferentes transportadores y canales iónicos. En el caso del gameto masculino, uno de estos canales es la proteína SLO3, canal de  $K^+$  poco selectivo el cual se expresa exclusivamente en el tejido testicular. Los espermatozoides de ratones nulos para el canal SLO3 presentan un fenotipo complejo con múltiples fallas fisiológicas. Entre estas fallas podemos encontrar: una morfología aberrante en condiciones que simulan el microambiente del tracto genital femenino y la imposibilidad de realizar cambios en su patrón de movilidad, mismos que son fundamentales para que la fecundación ocurra. En el presente trabajo nos centramos en explorar las causas de las anomalías morfológicas y motrices de los espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup>, encontrando como dato más relevante que la presencia de albúmina en el medio es el factor que induce las anomalías morfológicas en los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> y que esto está directamente relacionado con la remoción del colesterol de la membrana plasmática. Por otro lado, con respecto a la movilidad de los espermatozoides, se ha propuesto que la actividad de SLO3 podría contribuir a la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la preparación del espermatozoide para fecundar al óvulo, la cual podría contribuir a aumentar la fuerza impulsora que permite el aumento de  $Ca^{2+}$  requerido para cambiar el patrón de nado. En este trabajo, también observamos que es posible inducir de manera farmacológica transiciones en los patrones de nado de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> incrementando el  $Ca^{2+}$  a través de su liberación desde reservorios internos, pero no al incrementarlo desde la región extracelular a la citoplasmática. Esto sugiere que la hiperpolarización mediada por el canal SLO3 es requerida para que el incremento de  $Ca^{2+}$  sea suficiente para determinar un cambio importante en la movilidad de los espermatozoides de ratón.

## Summary

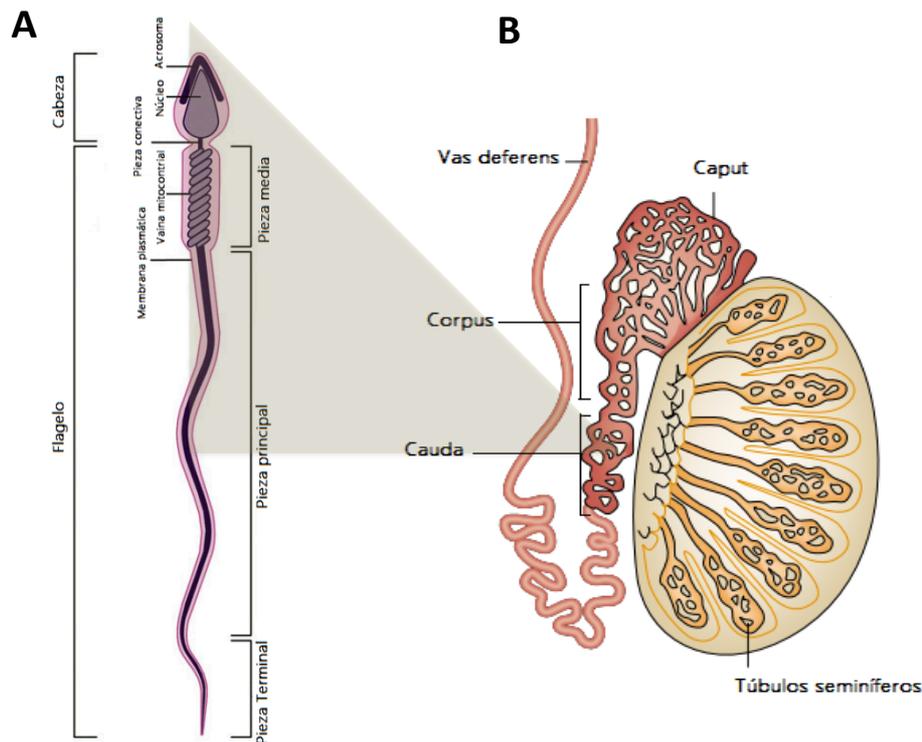
Fertilization in sexual reproduction organisms consists in the fusion of the sperm with the oocyte. This process requires the participation of different transporters and ionic channels. In the case of sperm, one of these channels is a protein called SLO3, a  $K^+$  channel with low selectivity, which is expressed exclusively in testicular tissue. Sperm from null mice for this channel have a complex phenotype with several physiological problems. One of these problems is the abnormal morphology, which is observed after recovering the sperm in a media, which simulates the conditions of the female genital tract. Also, the sperm from SLO3<sup>-/-</sup> mice are unable to achieve fundamental changes in their motility patterns, which are required to fertilize the oocyte. In this thesis we explored the causes of the abnormal morphology present in SLO3<sup>-/-</sup> sperm and we also explored the reasons behind the inability to achieve the transitions in their motility patterns. Our most important discovery was that the albumin is the component in the media that induces the abnormal morphology found in SLO3<sup>-/-</sup> sperm samples, and that this induction is related to the removal of cholesterol from sperm membrane. In the case of the motility studies, we found that we can induce the transitions in the motility patterns using a pharmacological approach in the SLO3<sup>-/-</sup> sperm. Addition of a drug that increases intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by opening internal  $Ca^{2+}$  reservoirs rescues the motility transitions. This suggests that the hyperpolarization mediated by SLO3 may be required to increase the  $Ca^{2+}$  levels that determine the change in the motility pattern.

## Introducción

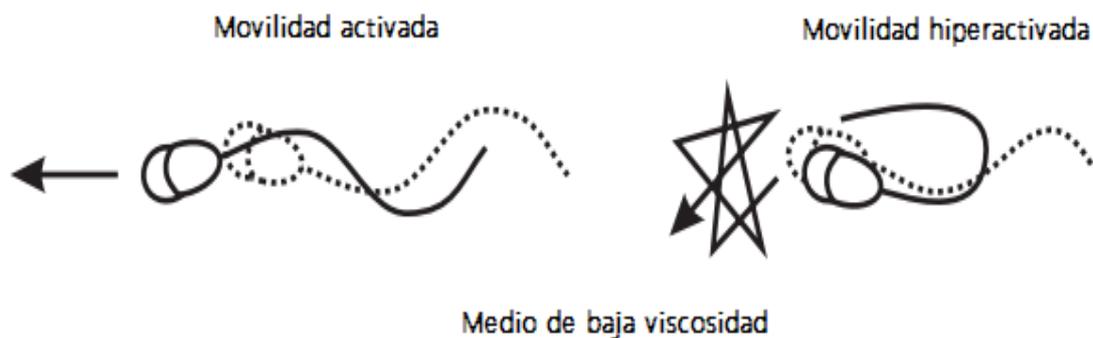
La fecundación es uno de los eventos más importante en la vida de todos los organismos de reproducción sexual. A escala individual, es el comienzo de la vida de un nuevo ser, a escala generacional, es un fenómeno que fomenta la variabilidad e influye directamente en la evolución de la vida en la tierra.

Este magnífico proceso, es la culminación de una odisea cuyo comienzo podemos rastrear hasta el tracto genital masculino, cuando los espermatozoides se liberan hacia el lumen de los túbulos seminíferos (espermiación), donde su maduración ocurre conforme se enfrentan a distintos cambios en el microambiente tubular. La maduración continúa al tiempo que los espermatozoides se transportan por contracción hacia el epidídimo caudal, donde serán almacenados en estado inmóvil hasta que ocurra la eyaculación (Figura 1).

La exposición de los espermatozoides al microambiente genital femenino tras la eyaculación, provoca un “despertar” en los espermatozoides, puesto que influye en su movilidad. Esta activación depende directamente del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y puede dividirse en dos tipos: (1) **movilidad activada**, en la cual el flagelo presenta una curvatura simétrica, un movimiento rápido y una amplitud pequeña. Los espermatozoides activados presentan una movilidad progresiva en medios de baja viscosidad, (2) **la movilidad hiperactivada**, implica un movimiento flagelar asimétrico, lento y una amplitud mayor (Darszon et al., 2011). Los espermatozoides hiperactivados presentan un patrón de movilidad errático en medios de baja viscosidad (Figura 2). Se ha propuesto que la movilidad hiperactivada le permite al espermatozoide desplazarse a través del oviducto en un ambiente sumamente viscoso, este tipo de movilidad también le permite despegarse del epitelio (Ho, 2001) y penetrar las capas externas del óvulo.



**Figura 1. Estructura del espermatozoide maduro y del testículo.** (A) Se muestra un el esquema de un espermatozoide maduro, el cual está conformado principalmente por: una cabeza, en la cual se encuentra el acrosoma, y el flagelo, el cual le permite movilizarse hasta llegar al óvulo (Imagen modificada de Borg et al., 2010) (B) Testículo y estructuras asociadas por las que transitan y maduran los espermatozoides. Posterior a la espermiación los espermatozoides se transportan por el lumen de los tubulos hasta el epidídimo caudal, en donde se almacenan en estado inmóvil a una osmolaridad de aproximadamente 400 mmol/kg (Imagen modificada de Cooke & Saunders. 2002).



**Figura 2. Movilidad de los espermatozoides de mamífero.** Movilidad activada (izquierda) e hiperactivada (derecha), se observa la forma flagelar y la dirección del movimiento que presentan espermatozoides en medio de baja viscosidad. Los espermatozoides activados avanzan con un patrón simétrico de batido flagelar, en cambio los hiperactivados se mantienen en un mismo lugar y no avanzan de manera progresiva debido al patrón asimétrico de batido flagelar (Imagen modificada de Darszon et al., 2011).

Como mencioné anteriormente, los espermatozoides eyaculados pueden comenzar a moverse en el tracto genital femenino y en condiciones que simulan este microambiente, sin embargo, son incapaces de fecundar al óvulo. Para adquirir esta capacidad es necesario que permanezcan algún tiempo en el tracto genital femenino y se **capaciten**. El proceso de capacitación implica la remoción del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, un aumento en el pH y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular así como en la permeabilidad del  $\text{K}^+$  y en los niveles de segundos mensajeros (AMPc,  $\text{IP}_3$ , diacilglicerol) y en la fosforilación de ciertas proteínas (Visconti, 2009), (ANEXO1). La capacitación puede simularse *in vitro* en un medio rico adicionado con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y albúmina sérica bovina (BSA), compuesto que simula el papel de la albúmina endógena del tracto genital femenino. Un tercer y último proceso de suma importancia es **la reacción acrosomal (RA)**, evento excitotónico que en el caso de los mamíferos consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, exponiéndose así el sitio de unión al óvulo y produciéndose una liberación de enzimas líticas que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo para finalmente, fusionarse con su célula complementaria (Darszon, 2006).

Paralelamente a los tres procesos morfofisiológicos descritos anteriormente (**activación de la movilidad, capacitación y reacción acrosomal**) los espermatozoides tienen que enfrentarse también al cambio en la osmolalidad del medio (concentración de partículas osmóticamente activas, disueltas en cada kilogramo de solución). En el epidídimo caudal ésta es de 420 mmol/kg, en contraste con la de los fluidos del tracto genital femenino (330 mmol/kg en la vagina y 280-290 mmol/kg en el moco cervical) (Yeung et al., 2006). Debido a esta disminución en la osmolalidad, se activan los mecanismos de regulación del volumen celular, los cuales evitan la hinchazón y la pérdida de viabilidad de los gametos masculinos.

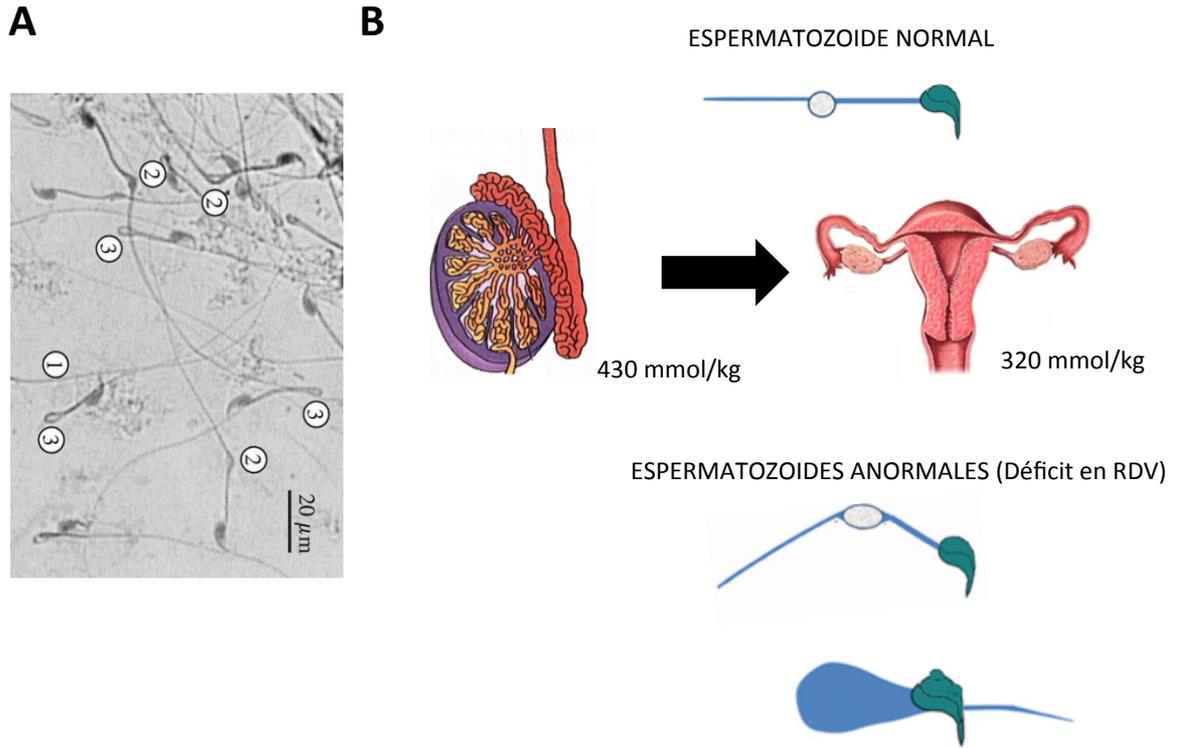
La regulación del volumen se ha caracterizado temporalmente a través de experimentos de citometría de flujo. Se sabe que a los 10 minutos tras la exposición de los espermatozoides a un medio hipotónico que simula el del microambiente uterino, los espermatozoides incrementan su volumen. A los 60 minutos de exposición al medio hiposmolar, gracias a los mecanismos de regulación del volumen, los espermatozoides recuperan su volumen original o incluso llegan a tener un volumen menor, a este proceso se le conoce como regulación de la disminución del volumen (RVD, por sus siglas en inglés). La capacidad de RVD se adquiere conforme los espermatozoides continúan su maduración a lo largo del epidídimo, siendo exclusiva de la población considerada madura, la cual se almacena en el epidídimo caudal. Esto se deduce a partir del hecho de que los espermatozoides del epidídimo caput y del corpus (regiones epididimales anteriores a la región caudal, en donde continúa el proceso de maduración, ver Figura 1), no pueden realizar una RVD exitosamente cuando se someten a condiciones hipotónicas (Humstoe et al., 2006).

El proceso de regulación isovolumétrica, implica la incorporación de osmolitos disponibles en el lumen del epidídimo. Los osmolitos adquiridos en el epidídimo se pueden usar posteriormente en la regulación del volumen cuando los espermatozoides lleguen al tracto genital femenino (Barfield et al., 2005). Algunas de las proteínas que podrían estar

directamente involucradas en la regulación del volumen de varios tipos celulares y que también se han encontrado en espermatozoides son: la acuaporina 1 (AQP1, CHIP28) en bovino, AQP7 y AQP8 en ratas, transportadores de glucosa (GLUT) en humano y ovejas y GLUT3, GLUT5 y GLUT8 en humano. En el caso de estos últimos se ha propuesto que además de participar en el metabolismo de la glucosa, tienen un papel secundario como transportadores de agua ya que esta molécula puede pasar por difusión a través del poro de estos transportadores (Curry et al., 1995).

Otras proteínas que tienen una gran importancia en la regulación del volumen y que mencionaré con mayor énfasis más adelante, son los canales de potasio, sin embargo no se han realizado reportes detallados acerca del papel de estos canales en la regulación del volumen del espermatozoide (Humstoe et al., 2006).

Aunque no se conocen a detalle los mecanismos que participan en la regulación del volumen en el espermatozoide, es interesante que los ratones con un déficit en la RVD (Figura 3), presentan un fenotipo de infertilidad debido a que la hinchazón conlleva a una falla en la migración y por lo tanto a la incapacidad de movilizarse del útero hasta el oviducto (Yeung et al. 2005).



**Figura 3. Morfología del espermatozoides ante problemas de RDV.** (A) Caso extremo de déficit en la RDV para un ratón nulo para el receptor de la tirosina cinasa *c-ros*, mismo que presenta un esterilidad. Se observa un flagelo normal indicado (número 1) y flagelos anormales : angulados (número 2) y en horquilla (número 3) (Yeung et al., 2006) (B) Tras la eyaculación los espermatozoides pasan de un medio de 430 mmol/kg a uno de 320 mmol/kg, ante este cambio es necesario que se activen mecanismos de RDV, mismos que permiten que el espermatozoide mantenga una morfología normal en las condiciones hiposmolales del tracto genital femenino y pueda movilizarse hasta llegar al óvulo y fecundarlo (Imagen modificada de Cooper, 2011).

## Antecedentes

### El K<sup>+</sup> en la regulación del volumen

La concentración intracelular de K<sup>+</sup> en el espermatozoide es alrededor de 90-120 mM (toro y ratón) (Babcock, 1983; Zeng et al. 1995). Dado que el K<sup>+</sup> tiene un papel fundamental en la regulación del volumen en las células somáticas (Lang, 2007), se puede inferir que este ion, así como los canales que lo transportan, son elementos importantes en la regulación del volumen de los espermatozoides. Estudios en espermatozoides de: el ratón, el toro, el jabalí, el humano, el perro y el mono, han sustentado esta idea, pues la quinina (bloqueador de amplio espectro para canales de potasio) provoca que las células se hinchen cuando se exponen a condiciones hiposmolares. Esta hinchazón pueden revertirse utilizando un ionóforo (molécula soluble en lípidos la cual permite aumentar la permeabilidad de la membrana biológica a ciertos iones, permitiendo que se movilizan de acuerdo a su gradiente electroquímico) de K<sup>+</sup> llamado valinomicina (Barfield et al., 2005).

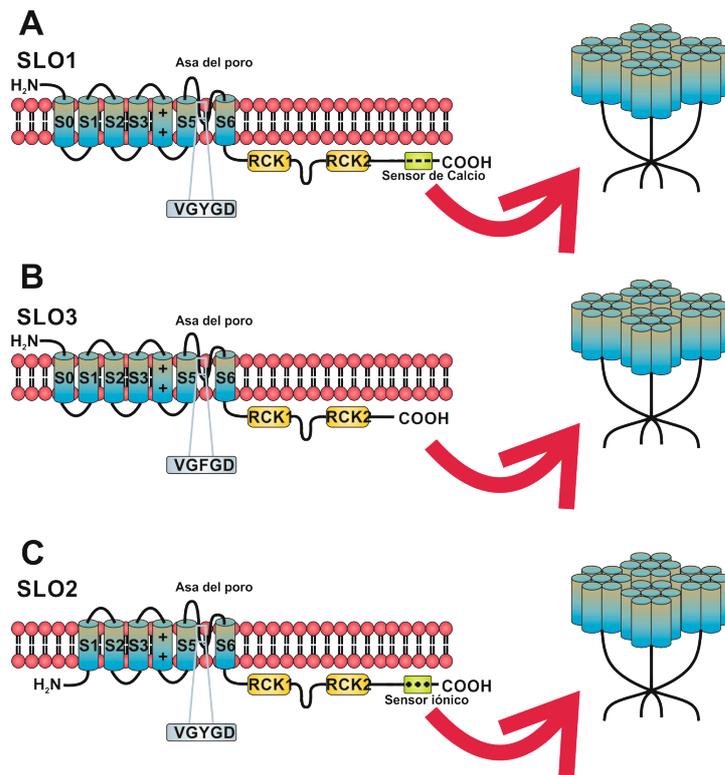
### Canales de K<sup>+</sup> de la familia Slo

Se sabe de cuatro genes que codifican para los canales de K<sup>+</sup> en la familia Slo: Slo1, Slo2.1, Slo2.2 y Slo3. Estos genes codifican para subunidades  $\alpha$ , las cuales forman un tetrámero. La forma en la que estos canales se regulan, su distribución y su estructura varían (Figura 4).

Los canales Slo1 son canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje en respuesta a un incremento de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, son de gran importancia ya que juegan un papel fundamental para regular la excitabilidad neuronal y muscular, y se encuentran en neuronas, músculos de los vasos sanguíneos, etc. (Salkoff et al., 2006).

Los canales Slo2, son codificados por los genes slo2.1 y slo2.2, son activados por Na<sup>+</sup> y no tienen el segmento transmembranal 0 (S0) ni S4. Slo2.2 se expresa en cerebro, riñón y testículo, Slo2.1 en los tejidos mencionados y en el corazón, músculo, pulmón e hígado (THE sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family).

Slo3 se diferencia de Slo1 y Slo2 puesto que es menos selectivo a K<sup>+</sup> sobre Na<sup>+</sup>. Esta reducción se debe a que los canales Slo3, a diferencia de los Slo1 y Slo2, tienen una Fenilalanina (F) en la secuencia firma de los canales de K<sup>+</sup> en lugar de una Tirosina (Y). Estos canales responden al cambio en el voltaje de la célula y también a cambios en el pH<sub>i</sub>, además de expresarse exclusivamente en el tejido testicular.



**Figura 4. Canales de  $K^+$  de la familia Slo.** Estructura de las subunidades  $\alpha$  de los canales Slo1 (A), Slo3 (B) y Slo2 (C), cada cuatro subunidades  $\alpha$  forman un tetrámero, el cual constituye al canal funcional. Los canales Slo se caracterizan por estar conformados por un gran segmento en el carboxilo terminal el cual contiene a los dominios citosólicos de regulación denominados RCK1 y RCK1 (dominios de regulación de  $K^+$  1 y 2, respectivamente), o al sensor de  $Ca^{2+}$  en el Slo1 (A). El dominio que monitorea al  $Ca^{2+}$  está ausente en el Slo3 (B) y modificado en el Slo2 (C), donde las cargas positivas fueron reemplazadas por cargas negativas. El Slo2 también se distingue porque contiene un amino terminal intracelular y la ausencia de cargas positivas en el S4. Slo1 y Slo3 están constituidos por siete segmentos transmembranales, siendo uno de estos el S0. El canal Slo3 difiere de los canales Slo1 y Slo3 en la firma de canales de potasio; los canales Slo3 presentan una Fenilalanina (F) que sustituye a la Tirosina (Y) presente en los otros canales Slo. Debido a esta diferencia los canales Slo3 son menos selectivos para  $K^+$  sobre  $Na^+$  en comparación de los canales Slo1 y Slo2.

### Slo3 y su posible papel en la regulación del volumen de los espermatozoides

Es de suma importancia resaltar que los espermatozoides de ratones nulos para SLO3 presentan múltiples defectos, entre los cuales se encuentran: movilidad anormal, aumento en el porcentaje de espermatozoides en forma de horquilla, fallas en la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal, ausencia de la hiperpolarización asociada a la capacitación (Santi et al., 2010). En suma, los espermatozoides de los ratones nulos para SLO3 son incapaces de llevar a cabo la capacitación. Algunos de los problemas anteriores o la conjunción de uno o más provocan que los espermatozoides de los ratones nulos para sean infértiles, incluso en protocolos de fertilización *in vitro*.

Una observación interesante es que el ratón nulo presenta un 60-70% de espermatozoides en forma de horquilla, morfología directamente relacionada a la incapacidad de llevar a cabo una regulación exitosa del volumen. En condiciones hiposmolales (i.e., al pasar la célula de un ambiente con una concentración externa de osmolitos menor a aquella en la que estaba suspendida) este fenotipo se anula al aumentar la osmolalidad del medio que rodea a los espermatozoides (Zeng et al. 2011). En base a la observación anterior surge la pregunta: ¿Sería posible rescatar el fenotipo de los espermatozoides de los ratones SLO3<sup>-/-</sup> relacionado a su movilidad, morfología flagelar, capacidad de reaccionar acrosomalmente e incluso llevar a cabo la fecundación *in vitro*, únicamente aumentando las osmolalidad del medio que los rodea?

Si la respuesta a la pregunta planteada es que sí, lo anterior implicaría que el canal SLO3 tiene un papel protagónico en el proceso de la regulación del volumen en los espermatozoides y que probablemente la incapacidad de los últimos para fecundar al óvulo, deriva de problemas desencadenados ante la imposibilidad de regular el volumen de forma eficiente. Con la finalidad de resolver la cuestión anterior planteamos la realización de los experimentos mencionados en la siguiente sección.

Por otro lado también abordamos el estudio de las anormalidades motrices de los espermatozoides utilizando una aproximación farmacológica para comprender la relación entre la hiperpolarización mediada por SLO3, los cambios en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> y la hiperactivación del espermatozoide.

## **Hipótesis**

SLO3 es necesario para la regulación del volumen y la hiperpolarización que permite la hiperactivación del espermatozoide de ratón.

## **Objetivos generales**

- A) Investigar si el canal SLO3 participa en los proceso de RDV
- B) Investigar los orígenes de la deficiencia en el proceso de hiperactivación en ausencia de SLO3 y su relación con el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera farmacológica

## Metodologías

### Manejo de ratones

Los ratones Slo3<sup>-/-</sup> y Slo3<sup>+/-</sup> utilizados en los experimentos pertenecen a una línea heterogénea con fondo genético de la cepa 129/Sv y C57BL/6, algunos de los ratones Slo3<sup>+/+</sup> utilizados fueron machos de la cepa ICR. Parte de los experimentos fueron realizados en Estados Unidos utilizando ejemplares del Bioterio de la Washington University School of Medicine en Saint Louis Missouri, donde se encuentra la línea fundadora de los ratones Slo3<sup>+/-</sup>. De esta línea, la Dra. Celia Santi donó algunos ejemplares, con los cuales iniciamos una nueva colonia en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los experimentos realizados en México se hicieron utilizando ejemplares de la colonia establecida y algunos ejemplares ICR cuya edad varió entre los 3 y 4 meses. Todos los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical justo antes de comenzar los experimentos.

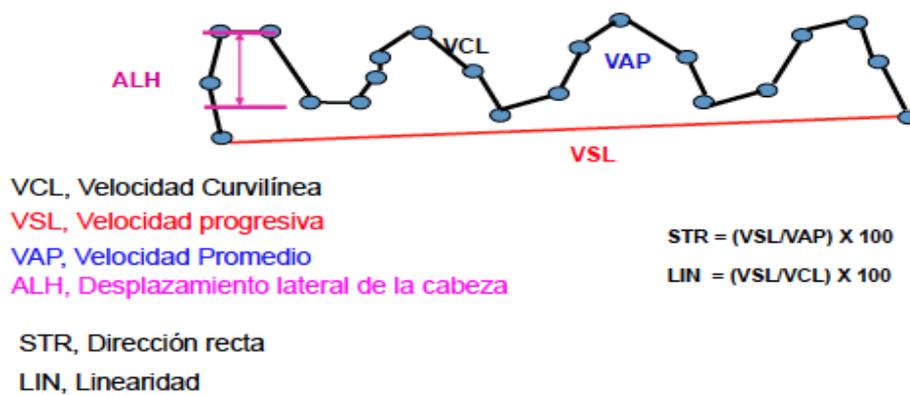
### Evaluación morfológica

La sección de estudios morfológicos y su relación con la osmolalidad se llevó a cabo en Washington University School of Medicine, bajo la tutoría de la Dr. Celia Santi. Para realizar estas pruebas extrajimos los epidídimos de cada ratón en medio HS no capacitante (en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES, 5 Glucosa, 10 Ácido láctico, 1 Piruvato, 5 de Glucosa, pH = 7.4, ajustado con NaOH) y HS no capacitante ajustado con Rafinosa (azúcar utilizada comúnmente para criopreservar espermatozoides) hasta 430 mmol/kg (Raf430). Colocamos uno de los epidídimos en un tubo con 500  $\mu$ l de medio no capacitante HS normal y el otro en 500  $\mu$ l de medio Raf430. Esperamos 10 minutos a que los espermatozoides se movilizaran al exterior del epidídimo (técnica del nado hacia arriba), pipeteamos suavemente la muestra tres veces para homogenizar la población de espermatozoides y colectamos 450  $\mu$ l de cada condición en un nuevo tubo. Esperamos a que la muestra se asentara durante 10 minutos. Tomamos alícuotas de cada condición de osmolaridad evaluada en cuatro tubos con 100  $\mu$ l cada uno. Agregamos a cada tubo otros 100  $\mu$ l de soluciones adicionadas con NaHCO<sub>3</sub> 50 mM y con BSA 10mg/ml, obteniendo así un total de ocho tratamientos: 1) HS normal, 2) Raf430 normal, 3) HSnormal + BSA 5 mg/ml, 4) Raf430 + BSA 5 mg/ml, 5) HSnormal + NaHCO<sub>3</sub> 25mM, 6) Raf430 + NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, 7) HSnormal + BSA 5 mg/ml + NaHCO<sub>3</sub> 25 mM (medio completo), 8) Raf430 + BSA 5 mg/ml + NaHCO<sub>3</sub> 25 mM (medio completo hiperosmolal). De cada tratamiento analizamos muestras de 16  $\mu$ l, colocándolas en celdas Hamilton Thorne Research 2X-CEL de 80  $\mu$ m de profundidad. Las celdas cargadas se colocaron en un microscopio Nikon ECLIPSE E600, y se tomaron videos de los espermatozoides para cada muestra utilizando el programa PM Capture Pro 6.0. Adquirimos de 15-25 videos de los ocho tratamientos en las dos condiciones de osmolaridad estudiadas. Posteriormente cada video se analizó utilizando el programa StreamPic5 Single Camara, contando de 100-200 células móviles por cada tratamiento y se clasificaron dependiendo de su morfología en angulados, horquillas y normales. La significancia de los datos fue evaluada utilizando la prueba de Tukey. El resto de las pruebas morfológicas fueron realizadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Claudia Treviño. En estas pruebas estudiamos los efectos de inhibidores de canales de K<sup>+</sup> (Clofillium 50  $\mu$ M y Quinidina 100  $\mu$ M), Ca<sup>2+</sup> (Ni 1 mM), un

agente removedor de colesterol de la membrana plasmática (Metil-B-Ciclodextrina), y el efecto ante la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (utilizando el agente quelante EGTA) en la morfología de espermatozoides  $\text{Slo3}^{-/-}$  y  $\text{Slo3}^{+/+}$ . Para lograr las condiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  externo ( $\text{Ca}^{2+}_e$ ) nm, utilizamos un medio HS con una concentración 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , obtuvimos los espermatozoides en este medio y previamente al conteo morfológico, diluimos la muestra 1:5 en un medio HS con  $[\text{0 Ca}^{2+}]$  y posteriormente agregamos la cantidad de EGTA necesaria quelar el  $\text{Ca}^{2+}_e$  hasta 100 nm. El protocolo para las evaluaciones morfológicas bajo las condiciones estudiadas en el Instituto de Biotecnología, fue prácticamente el mismo que en el caso del estudio del efecto de la osmolalidad, el BSA y el  $\text{NaHCO}_3$ , solo que en este caso los tratamientos consistieron en estudiar las nuevas condiciones (enlistadas anteriormente) y el microscopio que utilizamos para tomar videos de las muestras fue un Microscopio Zeiss Axioskop. De cada tratamiento se tomaron alícuotas de 15  $\mu\text{l}$  las cuales fueron colocadas en un portaobjetos estándar, los videos fueron tomados en campo claro con una cámara CCD Photometrics CoolSnapcf Monocromática a un aumento de 20X, posteriormente se cuantificaron las anomalías morfológicas en cada caso utilizando el programa Image J. Contamos entre 50 y 150 espermatozoides móviles por tratamiento.

### Pruebas de Movilidad

Los estudios de movilidad los realizamos en la Washington University School of Medicine con un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) tipo IVOS (Integrated Visual Optical System). Los sistemas CASA son sistemas operativos prediseñados por compañías especializadas en el análisis de semen de múltiples especies. Estos sistemas son de mucha utilidad puesto que te permiten registrar la trayectoria de una población entera de espermatozoides registrando, para cada una de las trayectorias registradas, múltiples parámetros simultáneamente de manera automática (Figura 5). Este tipo de sistema detecta la cabeza del espermatozoide en movimiento y sigue la trayectoria de los mismos por un tiempo establecido, tomando registro de su localización a una frecuencia de 60 Hz. El batido flagelar es simulado en base a la manera en la que la cabeza se moviliza. En los experimentos que realizamos, comparamos poblaciones de espermatozoides obtenidas a partir de ratones  $\text{Slo3}^{-/-}$  y ratones control en diversas condiciones.



**Figura 5. Esquema de parámetros de movilidad registrados a través de CASA.** Se muestra la trayectoria hipotética de un espermatozoide y se indican los principales parámetros registrados (ALH, VCL, VAP y VSL). La Dirección Recta (STR) y Linearidad (LIN) son porcentajes obtenidos mediante la relación indicada a la derecha.

Cada experimento realizado en CASA arroja una lista de datos con medidas cuantitativas de cada uno de los parámetros mencionados (Figura 5) para cada uno de los  $n$  espermatozoides que se desee rastrear. En nuestro caso, elegimos seguir la trayectoria de 300 espermatozoides por cada tratamiento (espermatozoides capacitados, no capacitados e incubados con procaína 5mM o timerosal 100  $\mu$ M), tanto en el caso de ratones silvestres como en el caso de ratones Slo3<sup>-/-</sup>. Con la finalidad de simplificar el estudio poblacional, construimos un programa en R para poder procesar los datos con mayor facilidad. Posteriormente le pedimos al programa realizar una “distribución promedio” juntando todas las trayectorias de los 300 espermatozoides/ tratamiento / ratón, en una sola distribución, esto para cada uno de los parámetros principales.

### Citometría de flujo

Se utilizó el citómetro de flujo FACSCanto II. Antes de cada experimento calibramos el equipo con perlas CS&T marcadas con una mezcla de fluorocromos que se excitan por los rayos láser del citómetro y cuya fluorescencia es detectada por el mismo, permitiendo fijar niveles de intensidad de fluorescencia con los cuales comparamos las muestras procesadas. Esta calibración tiene como finalidad maximizar la resolución y reconocer el ruido de fondo para descartarlo de los datos experimentales. Compensamos cada experimento con muestras no teñidas con fluoróforos (control negativo) y registramos 5 000 eventos de estas muestras utilizando el software FACSDiva. Para completar la compensación utilizamos muestras positivas para Yoduro de Propidio (IP), un colorante que se utiliza para evaluar viabilidad celular. Brevemente, la membrana en buenas condiciones de una célula viva es impermeable al IP en tanto una membrana de una célula dañada permitirá el paso del IP a la región intracelular. Las células positivas para IP las obtuvimos incubando los espermatozoides con tritón X-100 al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente. Además de la intensidad de

fluorescencia, el citómetro nos brinda datos que nos permiten clasificar células en función de su tamaño a través de la dispersión frontal (FSC), complejidad o granularidad a través de la dispersión lateral (SSC). Finalmente, para medir el volumen intracelular de una forma distinta a la FSC, decidimos observar los cambios en la fluorescencia de Calceína-AM (Ca-AM) en las distintas condiciones evaluadas. La lógica del sistema Ca-AM como sensor de volumen, puede revisarse a detalle en Alvarez-Leefmans et al. 1995, 2006 y Crowe et al. 1995. Brevemente, los cambios en el volumen total del agua (VTA) son medidos a través de cambios en la intensidad de fluorescencia del colorante (F), misma que resulta de un cambio en su concentración intracelular. Por lo tanto, siguiendo la lógica planteada por Alvarez-Leefmans, pensamos que si el volumen de los espermatozoides aumentaba en determinada condición, la fluorescencia de Ca-AM detectada por el detector de láser del citómetro, disminuiría.

## Resultados

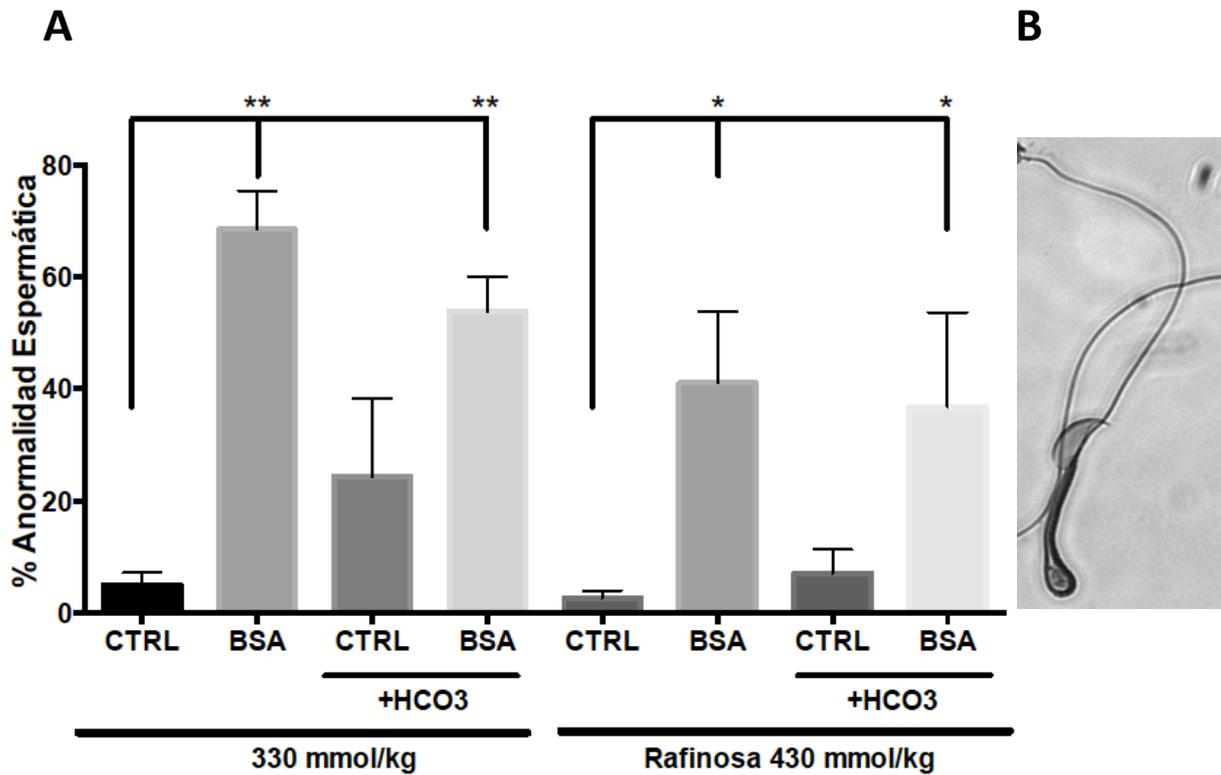
### Estudios de la morfología de espermatozoides

#### *La BSA altera la morfología de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup>*

En estudios realizados anteriormente se había observado que los espermatozoides colectados a partir de dos líneas de ratones SLO3<sup>-/-</sup> diferentes, presentan un 70% de espermatozoides anormales (en forma de horquilla o con angulación entre la pieza media y pieza principal). Estos fenotipos fueron observados por dos grupos de forma independiente (Santi et al., 2010 y Zeng et al. 2011). Zeng y colaboradores, describieron haber colectado los espermatozoides en un medio HS no capacitante con y sin NaHCO<sub>3</sub> obteniendo el mismo porcentaje de anomalías en ambas condiciones. También reportaron que es posible rescatar este fenotipo morfológico ajustando la osmolalidad a 430 mmol/kg con NaCl.

Por su parte en el trabajo de Santi y colaboradores, los espermatozoides de su línea de ratones SLO3<sup>-/-</sup> se colectaron únicamente en un medio HS capacitante (i.e., 20 mM NaHCO<sub>3</sub> + BSA 5 mg/ml) y se asumió que las anomalías morfológicas serían las mismas en el caso de coleccionar los espermatozoides en un medio no capacitante. Es decir que, estas anomalías eran independientes a la presencia o ausencia de NaHCO<sub>3</sub> y BSA en el medio en el que los espermatozoides eran recuperados.

A diferencia de lo observado en los experimentos de Zeng et al. 2011, nosotros encontramos un porcentaje de 95 %± 2 (n=3) de espermatozoides normales en ratones SLO3<sup>-/-</sup> (Figura 6) tras realizar el nado hacia arriba utilizando el medio HS no capacitante. Por lo anterior, pensamos que posiblemente esta angulación fue inducida por algún componente presente en el medio HS capacitante. Con la intención de encontrar el componente del medio HS capacitante que inducía la formación de horquillas en los ratones SLO3<sup>-/-</sup> realizamos experimentos adicionando independientemente BSA y NaHCO<sub>3</sub>. Identificamos al BSA como el agente inductor de la anomalía morfológica en los espermatozoides del ratón SLO3<sup>-/-</sup>, provocando un incremento de hasta 89% (Figuras 6 y 7) en el porcentaje de espermatozoides con angulaciones u horquillas flagelares tras su adición. También en contraste al rescate dependiente de la osmolalidad mencionado por Zeng et al., el ajuste que realizamos utilizando como osmolito a la Rafinosa en lugar del NaCl hasta llegar a 430 mmol/kg, no rescató de manera significativa la morfología de los espermatozoides.

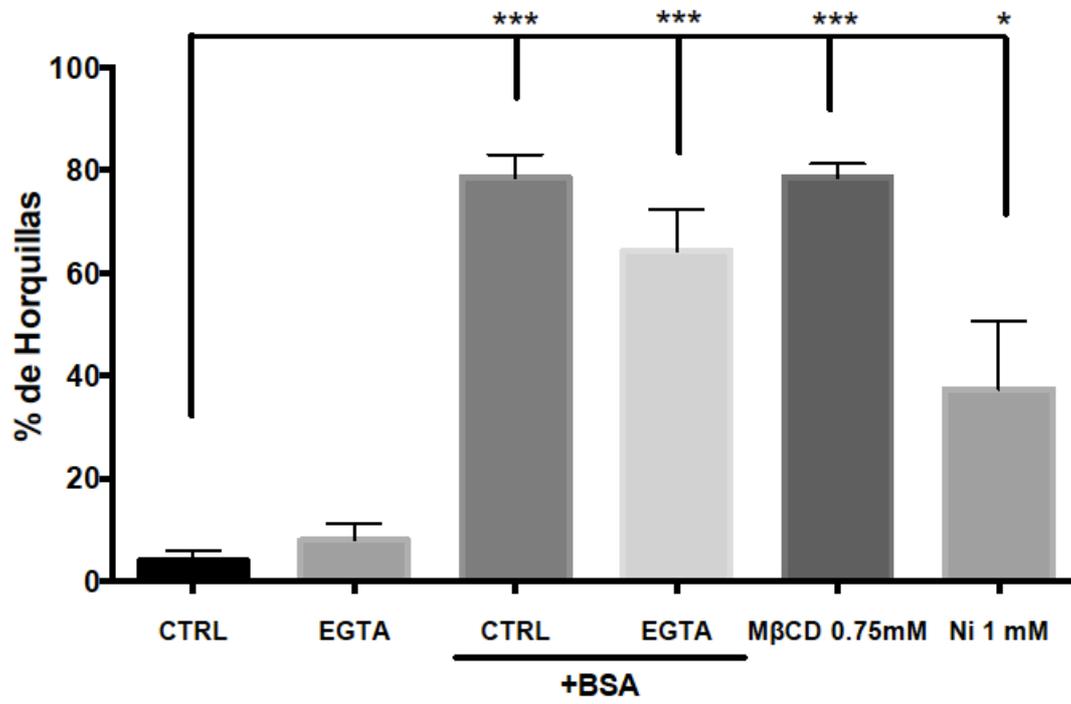
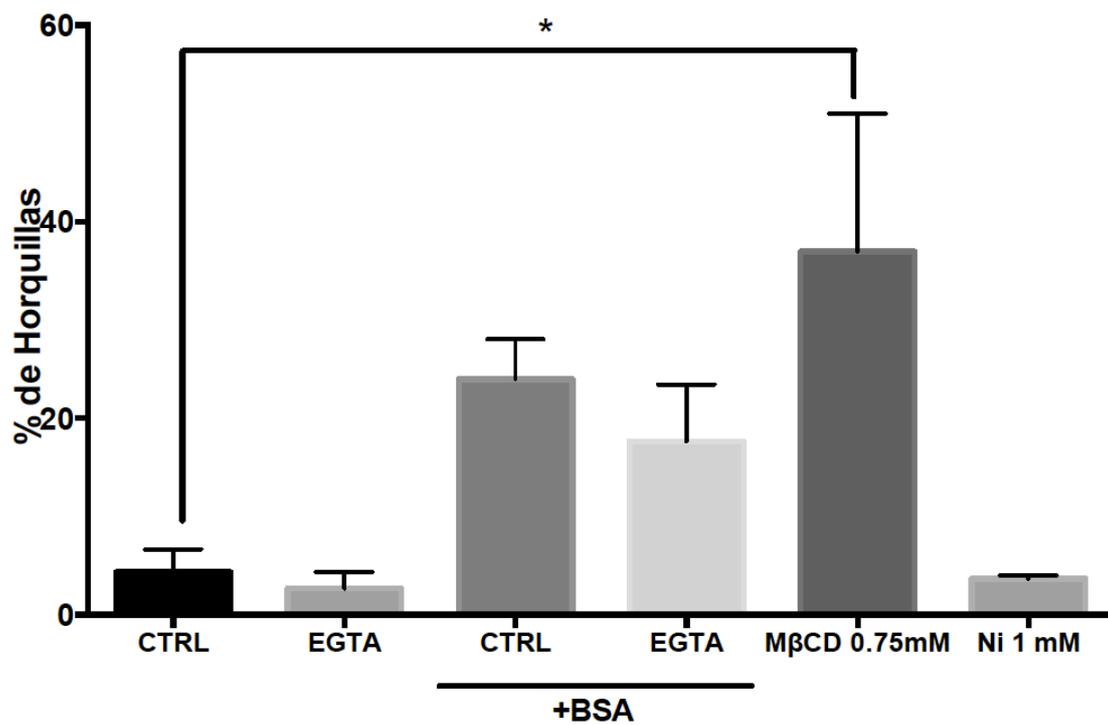


**Figura 6. Porcentaje de espermatozoides anormales del raton  $SLO3^{-/-}$  tras exponerlos a la BSA y  $NaHCO_3$ .** (A) Observamos un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides angulados y en horquillas tras la adición de la BSA tanto en el medio Hsnormal (330mmol/kg) como el ajustado con rafinosa (430 mmol/kg). (B) Fotografía en contraste de fases que muestra un espermatozoide en forma de horquilla. Las barras de las gráficas en A indican el error estándar, se realizó un ANOVA y una Dunnett's Post-test para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos, \*= $p > 0.05$ , \*\*= $p > 0.01$  (N=3 ratones, n=50-100 espermatozoides/ratón).

### *La Metil-β-Ciclodextrina (M-β-CD) altera la morfología de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup>*

Con la finalidad de explorar la posibilidad de que las anomalías morfológicas de los espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup> tuvieran una relación con la remoción del colesterol de la membrana plasmática realizamos pruebas utilizando Metil-β-Ciclodextrina (M-β-CD) 0.75 mM, compuesto que ha sido previamente utilizado para conocer el papel de la remoción del colesterol de la membrana en la fisiología del espermatozoide (Young-Ho Choi et al., 1998) ya que se sabe que funciona como un aceptor de colesterol. La M-β-CD indujo la formación de horquillas al mismo nivel que la BSA (Figura 7), provocando anomalías morfológicas hasta en un 87% de la población de espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> en comparación con un 37% en el caso de los espermatozoides SLO3<sup>+/+</sup>. Ya que tanto la BSA como la M-β-CD son agentes que remueven el colesterol de la membrana, podemos inferir que en el caso del ratón mutante SLO3<sup>-/-</sup>, la ausencia del canal SLO3 sensibiliza a la célula ante la remoción del colesterol, lo cual se ve reflejado en los cambios de la morfología flagelar, mismos que suelen estar relacionados con la incapacidad de llevar a cabo exitosamente el proceso de RDV.

Paralelamente, decidimos evaluar la posibilidad de que el BSA estuviese afectando la regulación del volumen en ausencia de SLO3, a través de la interacción con canales de Ca<sup>2+</sup> (Mc. Carty and Nail, 1992; Xia and Ren, 2009) por lo que estudiamos la morfología de espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> en dos condiciones: 1) a concentraciones extracelulares de 100 nM de Ca<sup>2+</sup>, esto utilizamos el agente quelante EGTA y 2) utilizando Ni 1 mM, pues se ha reportado que este metal es capaz de bloquear canales de Ca<sup>2+</sup> (Obejero-Paz et al., 2008; Hobai et al., 2000). Tras la adición de EGTA (Ver Metodologías) o Ni, incubamos los espermatozoides con BSA durante 5 minutos y cuantificamos su morfología bajo estas condiciones. En ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo, las anomalías morfológicas de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> y SLO3<sup>+/+</sup> no aumentaron ni se acentuaron en presencia de los removedores de colesterol (Figura 7), en cambio en presencia de Ni, se indujo la formación de horquilla en los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> hasta en un 40%. Esto indica que los mecanismos de regulación del volumen que se ven afectados en los espermatozoides, en ausencia del canal SLO3 y presencia de removedores de colesterol, son independientes del Ca<sup>2+</sup> externo.

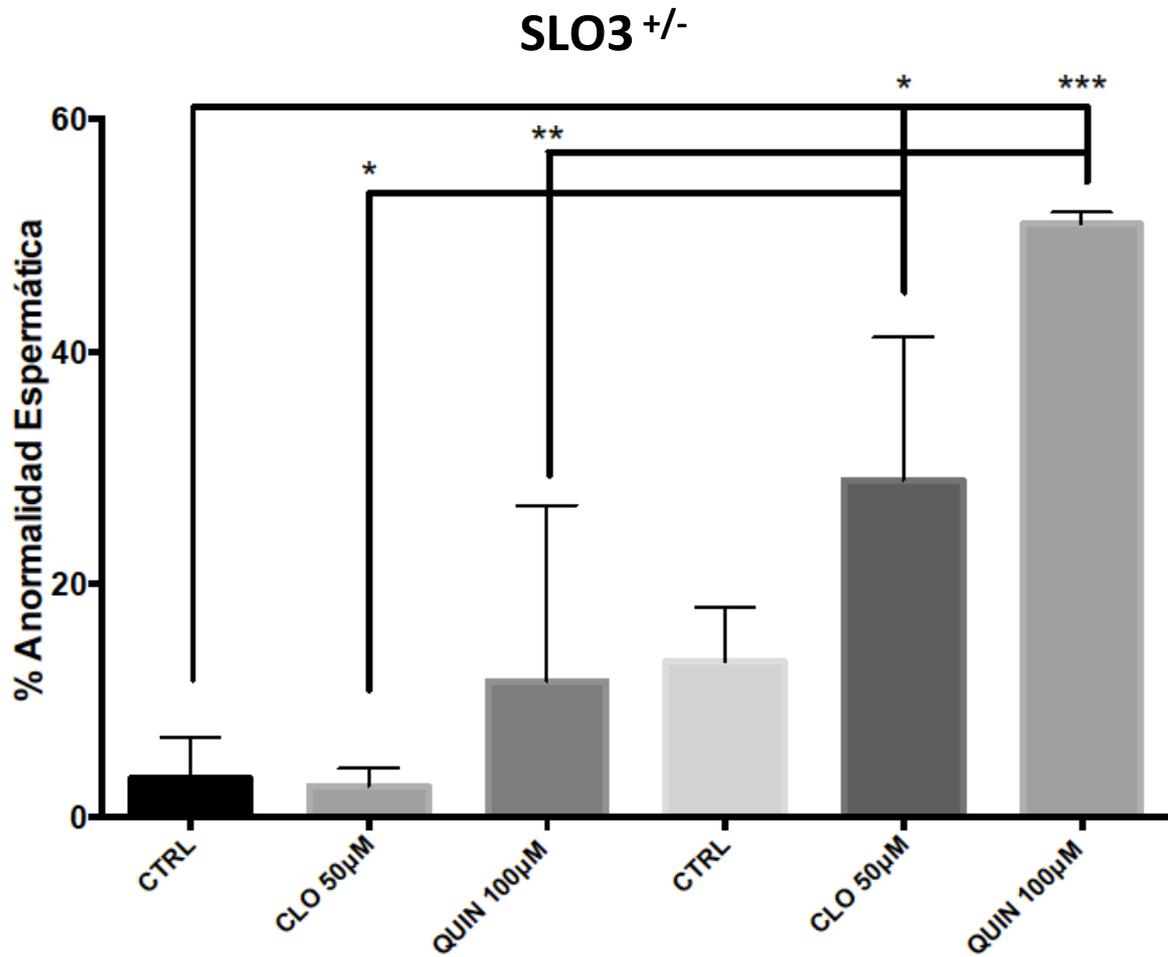
**A****SLO3<sup>-/-</sup>****B****SLO3<sup>+/+</sup>**

**Figura 7. En ausencia de SLO3, la remoción del colesterol induce la formación de horquillas a través de un proceso independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ .** Las gráficas muestran el porcentaje de espermatozoides en horquilla en distintos tratamientos estudiados. (A) Experimentos realizados con ratones  $\text{SLO3}^{-/-}$ , y (B)  $\text{SLO3}^{+/+}$ . (A) En el caso de ratones  $\text{SLO3}^{-/-}$  ocurrió un incremento significativo en el porcentaje de horquillas de espermatozoides incubados con los removedores de colesterol M- $\beta$ -CD y BSA, también se observa un incremento significativo del porcentaje de horquillas al utilizar Ni como bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , fenómeno que no ocurre en el caso del ratón  $\text{SLO3}^{+/+}$ . (B) En el caso de ratones  $\text{SLO3}^{+/+}$  las horquillas incrementan significativamente, únicamente tras la adición de M- $\beta$ -CD. Las barras de las gráficas indican el error estándar, se realizó un ANOVA y una Dunnett's Post-test para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos, \*=  $p > 0.05$ , \*\*=  $p > 0.01$ , \*\*\*=  $p < 0.001$  (N=3 ratones, n=50-100 espermatozoides/ratón).

***La incubación con clofillium 50  $\mu$ M y quinidina 100  $\mu$ M sensibiliza o mimetiza la sensibilidad a los espermatozoides Slo3<sup>+/-</sup> al BSA, promoviendo la formación de angulación flagelar y horquillas***

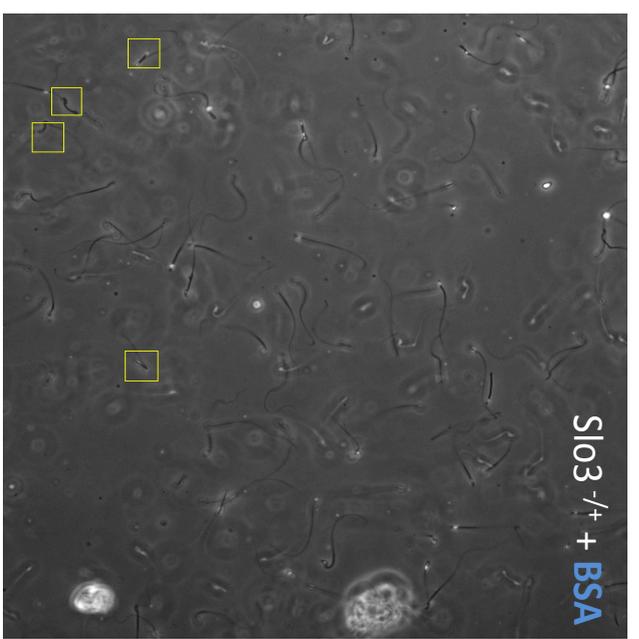
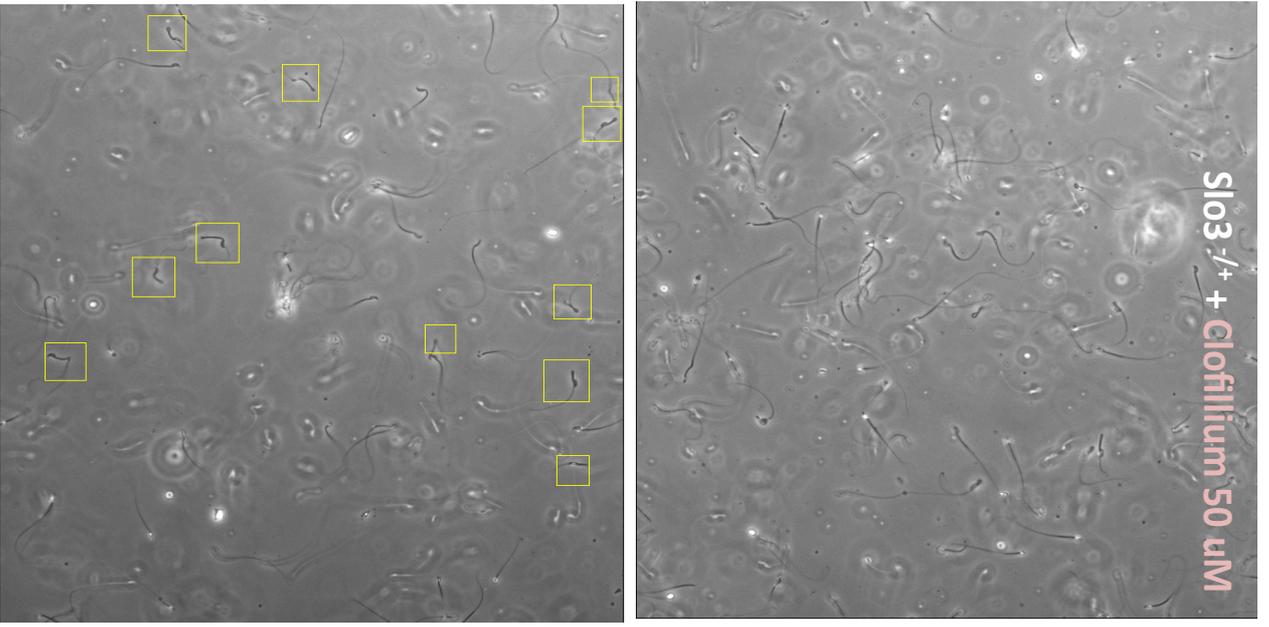
Se ha reportado que clofillium bloquea los canales SLO3 a concentraciones micromolares (Zeng et al., 2011) al igual que la quinidina (Tang et al., 2010). Conociendo lo anterior decidimos verificar si era posible simular el fenotipo de las anomalías morfológicas flagelares, observado en el ratón SLO3<sup>-/-</sup>, ahora utilizando ratones SLO3<sup>+/-</sup> y bloqueando el canal de manera farmacológica. Utilizamos ratones SLO3<sup>+/-</sup> puesto que son el genotipo más frecuentemente producido en la colonia y en el momento en el que realizamos los experimentos había un excedente que decidimos aprovechar dado el hecho de que los espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup>, presentan un fenotipo idéntico al de los ratones SLO3<sup>+/+</sup> en todos los aspectos reportados hasta el momento.

Tras una incubación de 15-20 minutos con clofillium 50  $\mu$ M y quinidina 100  $\mu$ M adicionamos o no la BSA 5 mg/ml y tomamos videos para contemplar la morfología de los espermatozoides, sólo consideramos aquellos espermatozoides que presentaban movilidad en el conteo mencionado en este estudio. La incubación farmacológica con los bloqueadores, aunada a la adición de BSA y la incubación con el mismo durante 10-20 minutos, incrementó de forma significativa a 48% en el caso de la Quinidina (Figura 8 y 9). Tomando la premisa de que las concentraciones de bloqueadores o inhibidores que decidimos utilizar son específicas para detener la actividad del canal SLO3, es posible decir que tras la incubación que realizamos con Clofillium y Quinidina, pudimos simular parcialmente el fenotipo morfológico de espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> tras la adición de la BSA 5 mg/ml. Lo anterior sugiere que SLO3 podría ser importante *in vivo* para evitar anomalías flagelares provocadas por los análogos del BSA endógenos al tracto genital femenino o la misma albúmina presente en éste, estas anomalías pueden deberse a un déficit en la regulación del volumen cuando SLO3 no está activo.



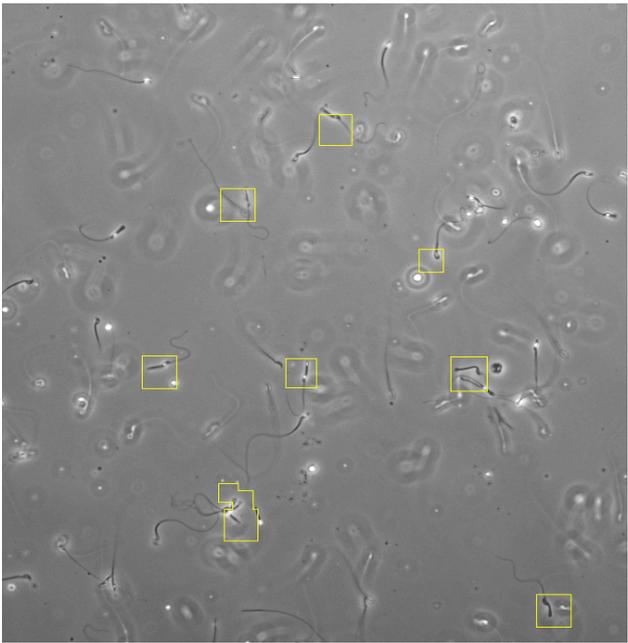
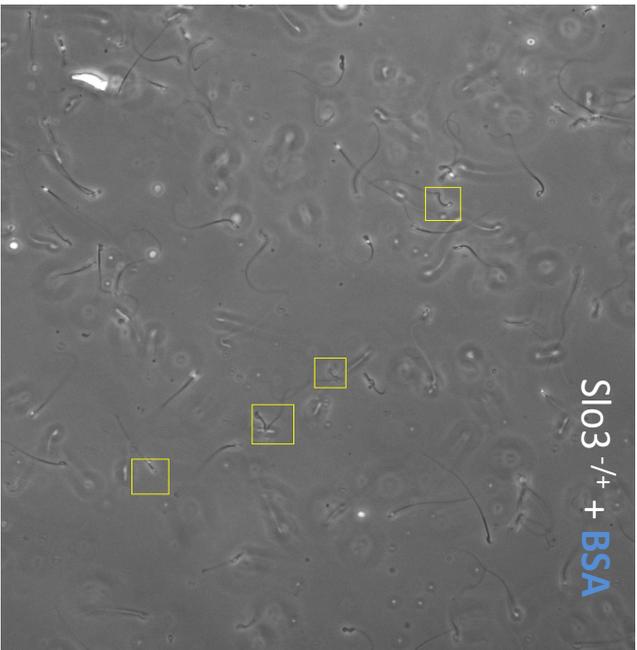
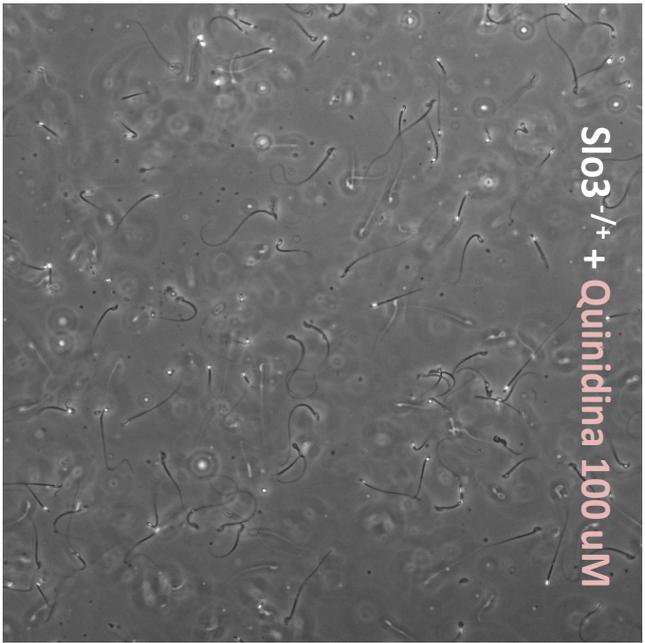
**Figura 8. Anormalidades morfológicas inducidas por el BSA en espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup> incubados con bloqueadores de SLO3.** Porcentaje de espermatozoides anormales en presencia y ausencia de los bloqueadores Clofilium, Quinidina y la adición subsecuente de BSA. Ocurrió un incremento significativo en las anormalidades morfológicas de espermatozoides incubados con los bloqueadores mencionados tras la exposición a BSA 5 mg/ml. Las barras de las gráficas indican el error estándar, se realizó un ANOVA y una Bonferroni Post-test para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos, \*= p>0.05, \*\*= p>0.01, \*\*\*= p< 0.001(N=3 ratones, n=50-100 espermatozoides/ratón).

**A**



**SIO3<sup>-/+</sup> + Clofiliumum 50 uM + BSA**

**B**



**SLO3<sup>-/+</sup> + Quinidina 100 uM + BSA**

**Figura 9. El BSA afectó la morfología de los espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup> tras la incubación por 15-20 minutos con clofillium y quinidina.** Fotografías en contraste de fases de espermatozoides Slo3<sup>-/+</sup> tras la incubación con clofillium (A) y quinidina (B), prácticamente no hay horquillas presentes. Tras la adición de BSA a los espermatozoides incubados con estos fármacos, el número de horquillas incrementó drásticamente (Imagen inferior). (N=3 ratones, n=50-100 espermatozoides/ratón/tratamiento).

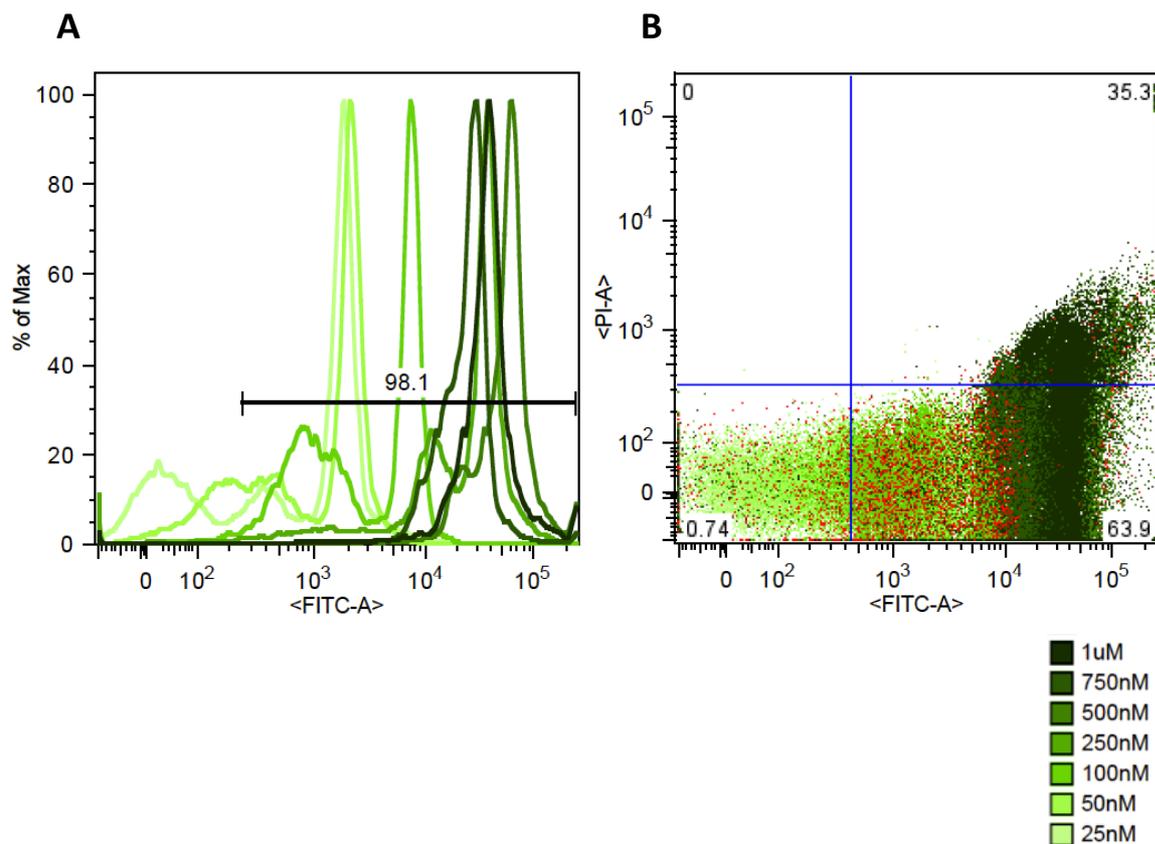
## Estudios utilizando citometría de flujo

### *Curva de titulación para Ca-AM*

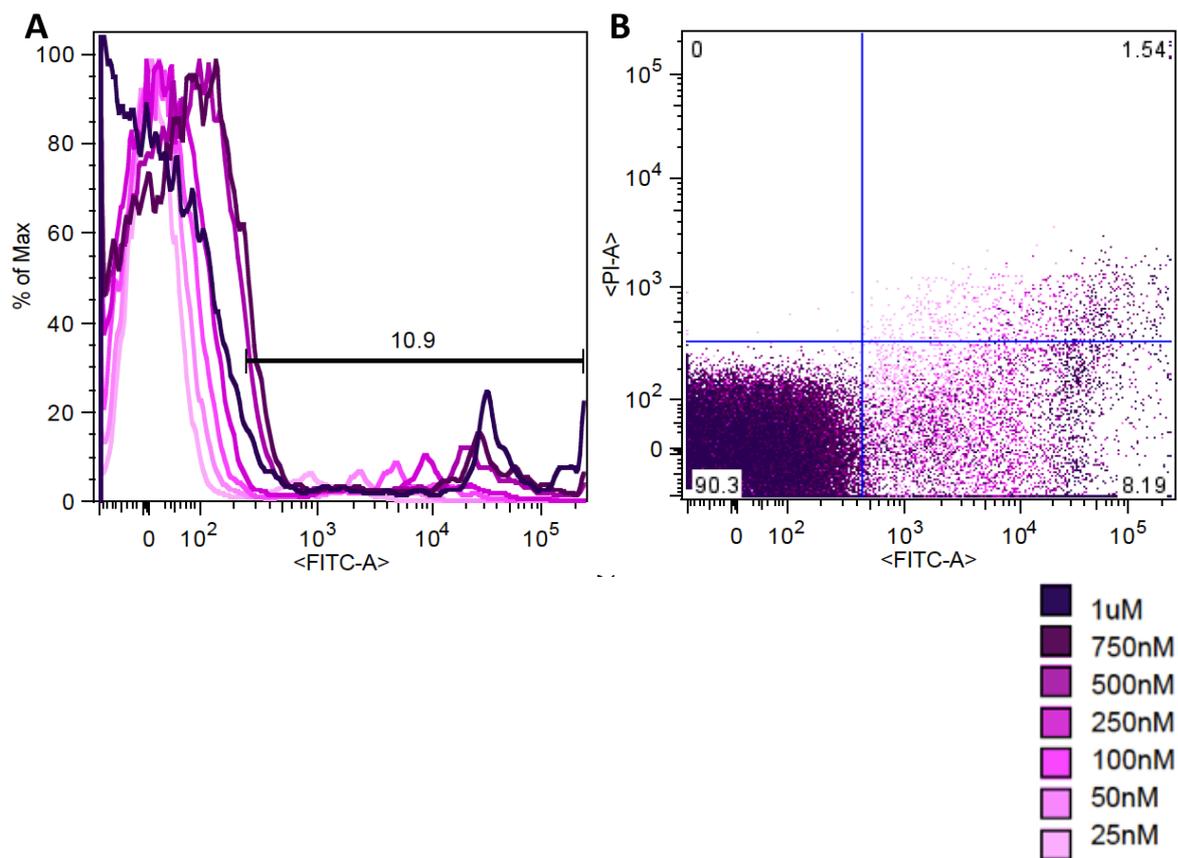
Como mencioné anteriormente (Ver Metodologías: Citometría de Flujo), el citómetro de flujo nos permite cuantificar: el tamaño de las células estudiadas a través del FSC, su complejidad y granularidad, a través del SSC y el cambio en la fluorescencia de colorantes y fluoróforos aplicados, todo esto a través de los sistemas de láseres y detectores incluidos en el aparato.

Para explorar mediante otra técnica el hecho de que los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> presentan anomalías morfológicas cuando son expuestos a BSA (Figura 5) y constatar que éstas se relacionan con cambios de volumen detectables: decidimos verificar si este cambio podía verificarse utilizando citometría de flujo. Aplicamos el fluoróforo Calceína-AM (Ca-AM) para intentar detectar cambios pequeños en el volumen de los espermatozoides (Para detalles de la lógica subyacente a esta detección, Ver Metodologías: Citometría de Flujo).

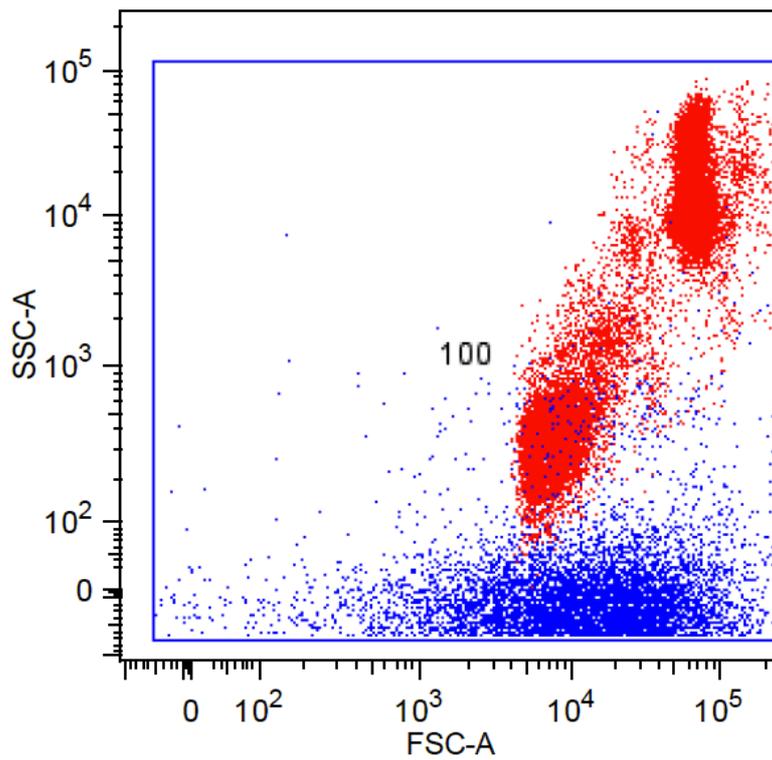
La concentración de Ca-AM que elegimos utilizar fue 250 nM, pues ésta fue suficiente para marcar un 98% de la población, indicado por el parámetro % Max (Figura 10). De las células positivas para Ca-AM sólo consideramos aquellas negativas para Ioduro de Propidio (IP), población que puede observarse en el cuadrante inferior derecho de la Figura 10. Este cuadrante indica las células negativas para el IP y positivas para Ca-AM, el cual en este experimento representativo equivale a un 64% de la población. También realizamos una curva de titulación utilizando las mismas concentraciones de Ca-AM en presencia de rafinosa, pues deseábamos verificar si el ajuste de la osmolalidad a 430 mmol/kg utilizando este galactosacárido podía rescatar el cambio morfológico de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> en presencia de BSA. Sin embargo, la rafinosa resultó interferir con la fluorescencia de las células cargadas con Ca-AM (Figura 12) así como con la del IP (datos no mostrados) utilizado para detectar células muertas. Además, la población de espermatozoides en presencia de rafinosa tuvo alteraciones tanto en su complejidad celular como en su volumen (Figura 12), algo que indican los cambios en SSC y en FSC, por lo que fue imposible comparar las poblaciones en medio hiperosmolar e hiposmolar. En conclusión, la rafinosa no es una molécula adecuada para ajustar la osmolalidad y evaluar su efecto en los espermatozoides en el caso de protocolos para citometría de flujo, puesto que su presencia afecta tanto el cargado de las células con IP y Ca-AM como la detección de la población de espermatozoides a través del FSC y SSC.



**Figura 10. Curva de titulación para Ca-AM.** Utilizamos diferentes concentraciones del fluoróforo (1 uM, 750 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM y 25 nM) (A). Poblaciones de espermatozoides marcados con las distintas concentraciones de Ca-AM, la población marcada con 250 nM está representada con puntos rojos (B). Decidimos utilizar 250 nM pues fue la concentración suficiente para marcar cerca del 98% de la población (A). En la gráfica de cuadrantes se representa la fracción de células negativas para Ca-AM y para IP (0.74), la positivas para Ca-AM y negativas para IP (63.9), misma que representa a las células vivas, y las positivas para Ca-AM y positivas para IP (35.3), fracción que indica las células muertas.



**Figura 11. Curva de titulación utilizando Ca-AM en presencia de rafinosa.** Utilizamos diferentes concentraciones del fluoróforo (1 uM, 750 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM y 25 nM) (A). La presencia de rafinosa afecta el cargado de las células con el fluoróforo, por lo cual no es posible detectar la fluorescencia de Ca-AM en las poblaciones de espermatozoides cargados. En A se indica que tras la incubación 250 nM con Ca-AM tan solo el 10.9% de la población es positiva para este fluoróforo, en B observamos que tanto para Ca-AM como para IP el marcaje de los espermatozoides en el medio de rafinosa es prácticamente nulo, habiendo tan solo una fracción de 8.19 positiva para Ca-AM y una de 1.54 positiva para IP y Ca-AM en tanto 90.3 es negativa para ambos compuestos.



**Figura 12. La presencia de rafinosa afecta la complejidad y el volumen de la población celular.** Observamos un cambio drástico en la complejidad y tamaño de la población de células suspendidas en el medio ajustado con rafinosa (población Azul) con respecto a la población suspendida en medio HS normal (población Roja).

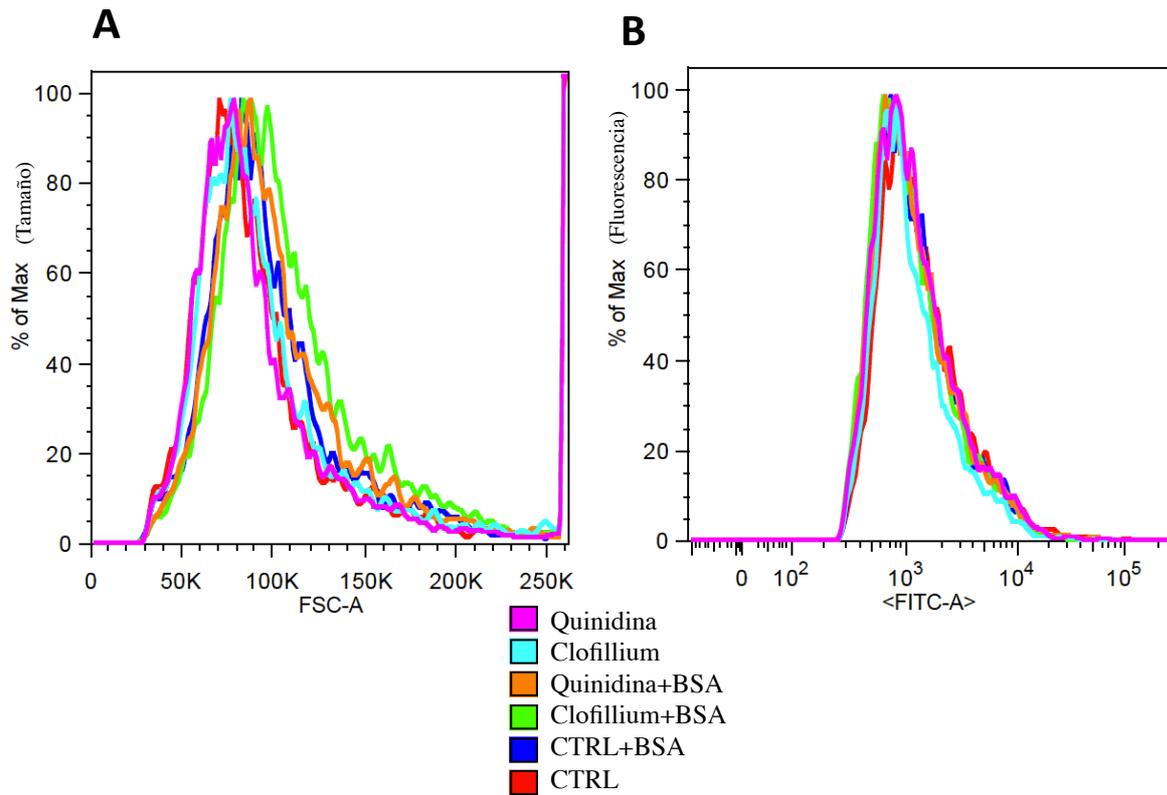
*Los cambios morfológicos inducidos por el bloqueo con Clofillium 50  $\mu$ M y Quinidina 100 $\mu$ M y la posterior adición de BSA no son detectados a través de la citometría de flujo*

En los estudios de morfología realizados, verificamos que el BSA induce anomalías en los espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup>, también observamos que al incubar espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup> con bloqueadores del Canal Slo3 y adicionar BSA posteriormente, se inducía la formación de horquillas y angulaciones flagelares (Figura 6). Es decir, es posible simular parcialmente el fenotipo del ratón SLO<sup>-/-</sup> en espermatozoides que presentan el canal SLO3, cuando su actividad se bloquea farmacológicamente. Existe información que relaciona el tipo de anomalías flagelares observado, con un déficit en la regulación del volumen, puesto que un defecto en ésta resulta en la hinchazón celular y el colapso del flagelo (Yeung et al. 2006). Por lo anterior, decidimos explorar la posibilidad de detectar un cambio en el volumen citoplasmático en espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup> tras la adición de BSA y en espermatozoides de ratones SLO3<sup>+/-</sup> incubados con diferentes bloqueadores de SLO3 y la posterior adición de BSA.

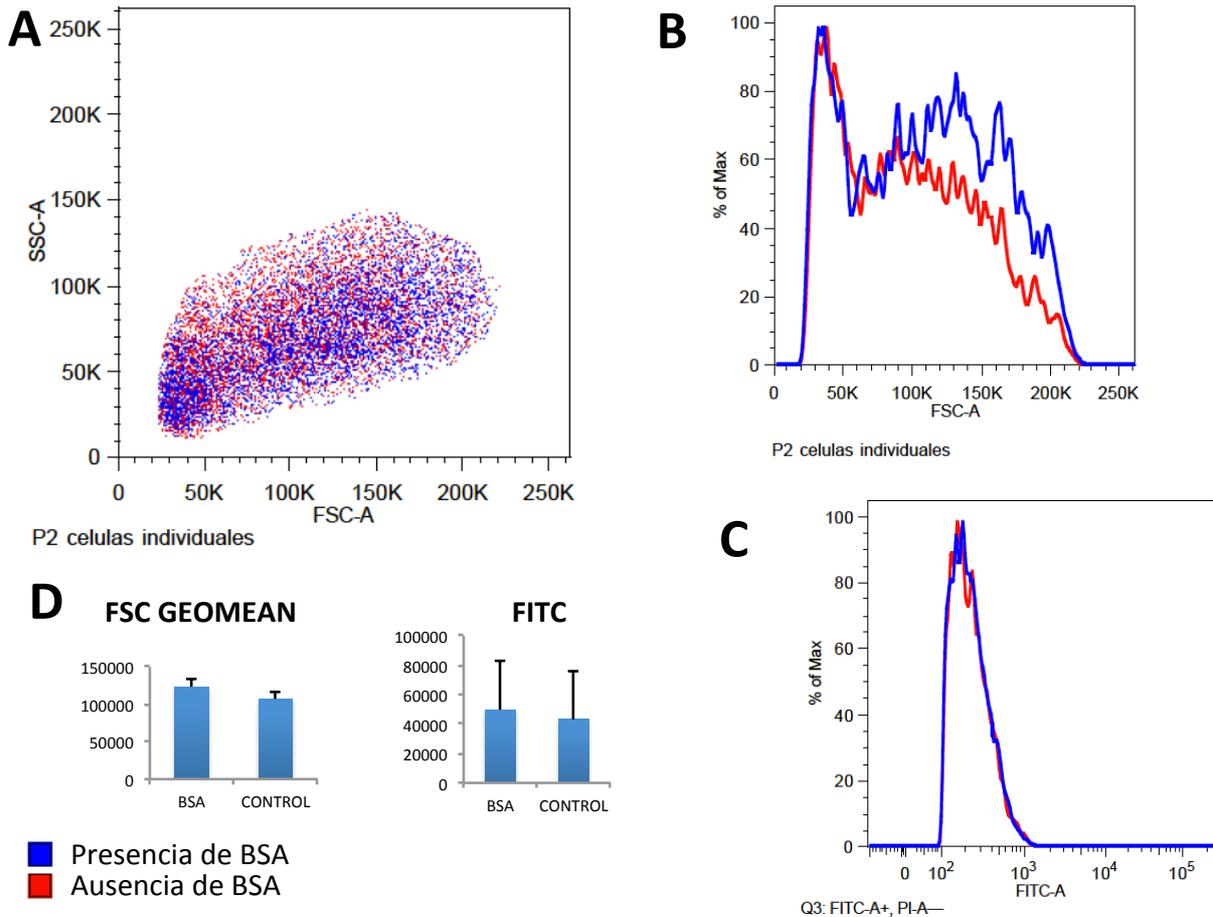
En el caso de espermatozoides provenientes de ratones SLO3<sup>+/-</sup> y SLO3<sup>+/+</sup> no hubo cambio aparente en el patrón de FSC, SSC ni en la fluorescencia de Ca-AM al agregar BSA tras la incubación con los bloqueadores: Clofillium 50  $\mu$ M y Quinidina 100  $\mu$ M (Figura 13). En el caso de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> tras la adición del BSA, tampoco pudimos detectar cambios en el volumen puesto que no hubo aumento en el FSC o una reducción en la fluorescencia de Ca-AM (Figura 14).

Esta imposibilidad de detectar cambios en el volumen se debe, posiblemente, a que los cambios experimentados en espermatozoides incubados con los bloqueadores, en presencia de BSA, son muy pequeños en la cabeza del espermatozoide y el efecto principal de la falta de la regulación del volumen se ve reflejado en el torcimiento del flagelo, cuyos cambios en el volumen podrían ser imposibles de detectar para el citómetro de flujo.

## SLO3<sup>+/-</sup>



**Figura 13.** El bloqueo con clofillium, quinidina y la posterior adición de BSA no afecta la dispersión lateral del láser (FSC) ni la fluorescencia de Ca-AM de la población de espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup>. (A) Histograma de FSC para espermatozoides SLO3<sup>+/-</sup>, hay un ligero h corrimiento de la población hacia la derecha tras la incubación con bloqueadores de Slo3 por 50 min y la posterior adición de BSA; sin embargo, este aparente incremento en FSC no es significativo, por lo que no podemos decir que el volumen aumenta de manera significativa tras los tratamientos descritos. (B) Picos de fluorescencia detectados en la población de espermatozoides cargados con 250 nM de Ca-AM, no se observó un cambio significativo en la fluorescencia tras los tratamientos realizados.



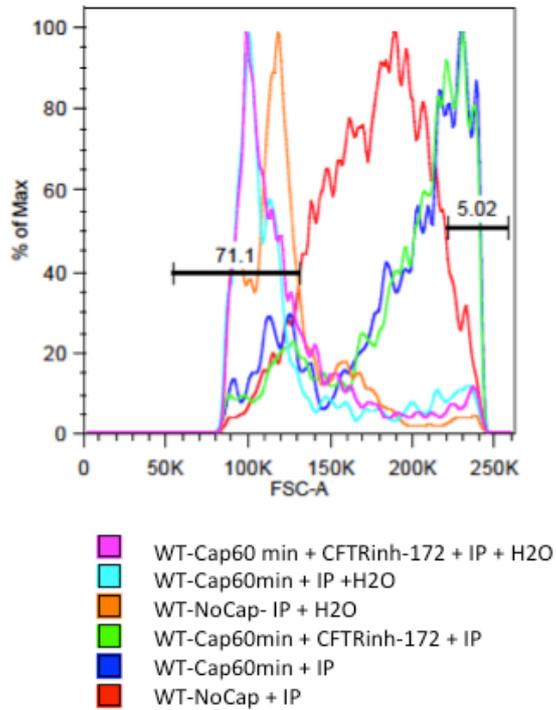
**Figura 14. La adición de BSA a espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> no afecta al FSC ni la fluorescencia de Ca-AM de forma significativa.** (A) Población de espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> antes (rojo) y después (azul) de la incubación con BSA, no se observa un desplazamiento de la población detectada a través de citometría de flujo. (B) Histograma de FSC, no se observa un desplazamiento significativo del pico poblacional de los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> tras la adición de BSA por lo que no podemos afirmar que la adición de este compuesto esté aumentando el volumen de la población de células estudiadas. (C) Pico de fluorescencia para Ca-AM, en este caso tampoco observamos un cambio significativo tras la adición de BSA. (D) Medias poblacionales para FSC y FIT-C, no hay cambios significativos en la población de espermatozoides estudiados tras la adición de BSA en el caso de ninguno de estos parámetros.

### *Cambios de volumen detectados a través del bloqueo del canal CFTR*

En los experimentos expuestos anteriormente no pudimos detectar cambios en el volumen tras la adición de BSA a los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> y a los espermatozoides SLO3<sup>+/+</sup> incubados con bloqueadores de SLO3, esto nos hizo considerar la posibilidad de que existiese una falla en el citómetro de flujo disponible, o en algún paso del protocolo experimental o de análisis de datos, misma que impedía que detectáramos cambios de volumen en las poblaciones de espermatozoides utilizadas. Para descartar posibles errores experimentales para detectar los cambios de volumen en nuestros procedimientos, decidimos replicar un experimento ya documentado en el cual se pudieran detectar cambios de volumen y paralelamente probar una condición hiposmótica extrema la cual esperábamos, indujera hinchazón en los espermatozoides (N.L. Simmons, 1983; L Drevius et al. 1966; Qui Chen, 2010), esto para verificar que un cambio drástico de volumen pudiera ser detectado por el citómetro. El experimento que decidimos replicar fue uno descrito en un artículo recientemente publicado el cual explora algunas propiedades del canal llamado Regulador de Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Cística (CFTR, por sus siglas en inglés). El canal CFTR transporta iones Cl<sup>-</sup>, lo cual permite controlar el transporte de agua en los tejidos. Además del trabajo anterior, la proteína CFTR regula la función de otros canales, como los transportadores de Na<sup>+</sup>. En el espermatozoide se ha propuesto que CFTR está presente puesto que hay evidencias obtenidas a través de farmacología, de inmunocitoquímica y de electrofisiología, y parece tener un rol importante en la capacitación del espermatozoide (Figueiras-Fierro D et al., 2013). Además, estudios realizados previamente utilizando el bloqueador de CFTR, CFTRinh-172, demostraron que existía un cambio en el volumen y en la complejidad celular de espermatozoides expuestos a este fármaco durante la capacitación (Figueiras-Fierro D et al., 2013). Sin embargo en los experimentos que repliqué utilizando el protocolo de este grupo no pude detectar un cambio evidente de volumen tras el tratamiento descrito. Las réplicas experimentales se realizaron siguiendo la descripción metodológica del artículo a excepción de que la suspensión de espermatozoides no fue filtrada a través del filtro mencionado (Red de nylon de 100-um - Small Parts, Inc. Miami Lakes. FL, USA-). A pesar de que no detectamos cambios del volumen tras la inhibición de CFTR, observamos que la población de espermatozoides capacitados, en presencia y ausencia del inhibidor, cambia ligeramente su volumen en contraste con la población no capacitada, aumentando un 6% la población cercana a los 250 K (Figura 12). En el eje x, K representa a la unidad que indica la intensidad en la luz dispersada siendo 0 el menor nivel y 250 K el más brillante, esta medida está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la observación anterior nos permitió certificar que era posible detectar cambios de volumen utilizando el protocolo de citometría utilizado previamente para los estudios morfológicos en presencia de BSA.

Se ha visto que en ciertos medios hipo-osmóticos, distintos tipos celulares tienden a aumentar su volumen, incluyendo los espermatozoides (N.L. Simmons, 1983; L Drevius et al. 1966; Qui Chen, 2010). Con la finalidad de verificar si era posible detectar un cambio en el volumen de los espermatozoides utilizando los parámetros de estandarización que utilizamos previamente en los experimentos, diluimos el medio en el cual se encontraban.

Contrariamente a lo esperado ante este tratamiento, logramos apreciar un decremento de volumen cuando los espermatozoides fueron resuspendidos en agua destilada en una proporción 1:1. El trazo representativo de la Figura 12 muestra como las poblaciones de espermatozoides capacitados, no capacitados y capacitados en presencia y ausencia del bloqueador de CFTRinh-172 40  $\mu$ M tras la adición de agua destilada, tienen un decremento del volumen, corriéndose hasta el 64% de la población hacia un tamaño de 150 K, lo cual indica que la intensidad de la luz dispersada por las células suspendidas en la muestra después del tratamiento disminuye, por lo que podemos inferir que su tamaño reduce o que la superficie de dispersión de la luz disminuye posiblemente a un colapso en la membrana de los espermatozoides diluidos.

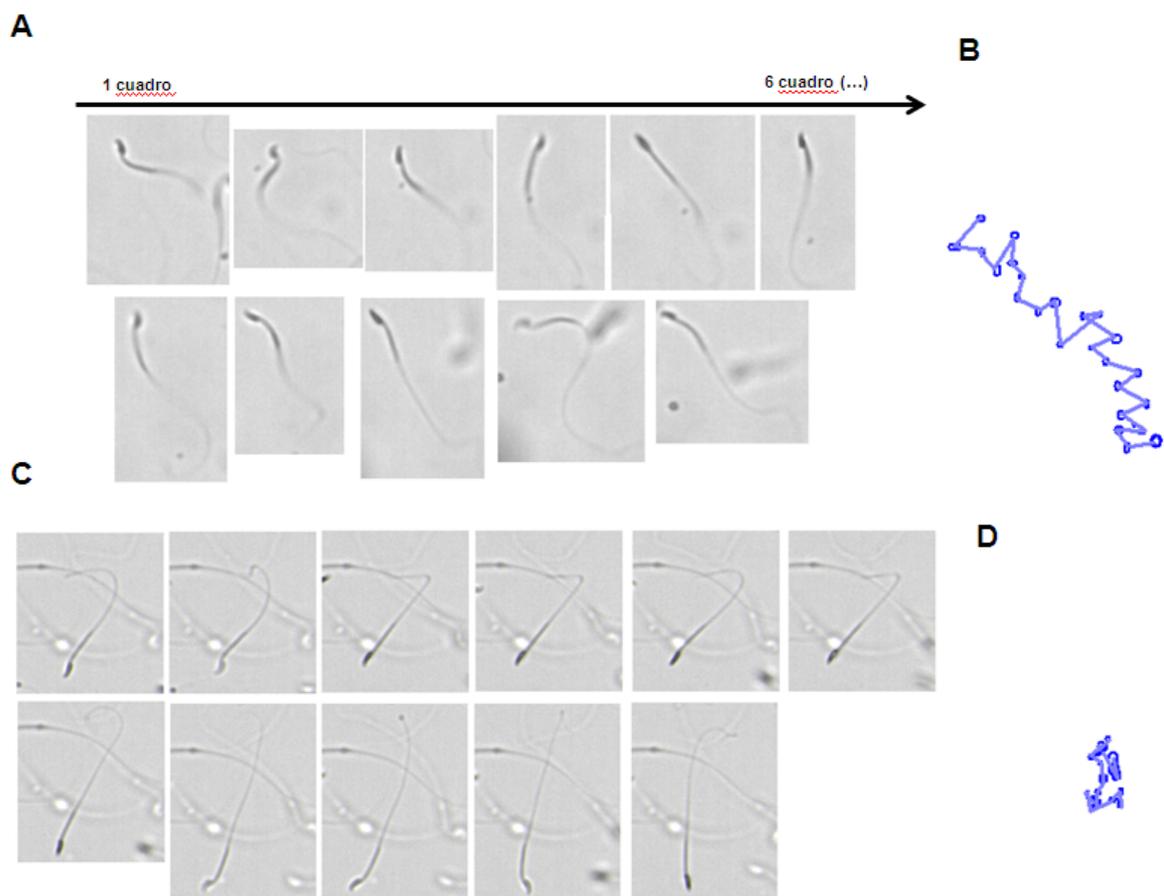


**Figura 15. La inhibición utilizando CFTRinh-172 durante la capacitación no produjo decremento significativo de volumen detectado a través del FSC.** Trazo representativo de las medidas de FSC obtenidas a través de la citometría de flujo. Hay un incremento significativo en el volumen de la población de espermatozoides tras ser capacitada. Al diluir las muestras de espermatozoides 1:1 en agua destilada se observa un decremento en el FSC lo cual implica un decremento en el volumen de la población de espermatozoides indicado por el corrimiento de los picos poblacionales trazados en morado, turquesa y naranja hacia los 100K. (n=3)

## Estudios de motilidad utilizando el sistema CASA

### *El ajuste a una osmolaridad de 430 mmol/kg afecta la movilidad de los espermatozoides*

En el presente proyecto se planteó la posibilidad de rescatar el patrón de movilidad de los espermatozoides de ratones *Slo3<sup>-/-</sup>* ajustando la osmolaridad del medio circundante. Sin embargo tanto en el caso del NaCl como en el caso de la Rafinosa, este ajuste anula la movilidad progresiva de los espermatozoides, provocando inmovilidad en los mismos (Figura 16). Por lo anterior, se cancelaron los estudios utilizando el sistema CASA en condiciones de alta osmolaridad.



**Figura 16. El ajuste con NaCl a 430 mmol/kg afecta la movilidad de los espermatozoides de ratones silvestres y mutantes.** Las secuencias de imágenes (A y C) muestran los movimientos de un espermatozoide del ratón silvestre en medio control (A y B) y otro en uno ajustado con NaCl a 430 mmol/kg (C y D). Esta condición afecta tanto al desplazamiento de la cabeza, como el batido flagelar. Lo anterior se aprecia en las trayectorias esquematizadas (B y D). Los videos para evaluar la movilidad se tomaron a 60Hz (120 cuadros/s), las secuencias muestran imágenes tomadas cada 11 cuadros (A y C). La posición de la cabeza de los espermatozoides se marcó cada 5 cuadros (círculos azul oscuro), las marcas fueron unidas indicando la trayectoria final (línea azul claro) (B y D).

*La hiperpolarización causada por SLO3 favorece el gradiente electroquímico del  $Ca^{2+}$  y esto es determinante en la transición de la motilidad activada a hiperactivada en los espermatozoides*

De forma paralela a los estudios morfológicos, colaboramos en estudios relacionados a la movilidad de los espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup> utilizando el sistema CASA. Higgins et al. (datos no publicados) habían obtenido datos que sugerían que a diferencia de espermatozoides provenientes de ratones silvestres, no hay subpoblaciones de los espermatozoides de ratones SLO3<sup>-/-</sup> que lleven a cabo la hiperactivación asociada con la capacitación. Se considera un espermatozoide hiperactivado aquel que presenta los siguientes valores en los parámetros que describen su trayectoria: VCL  $\leq 180$   $\mu\text{m/s}$ , ALH  $\leq 9.5$ , LIN  $\geq 30$  (Bray et al., 2005). Además de esta definición, un espermatozoide hiperactivado presenta una trayectoria caracterizada por una disminución en su STR así como en su VSL.

Además de la falla en el proceso de hiperactivación, en ausencia del canal SLO3, tras el proceso de capacitación, tampoco ocurre la hiperpolarización de la membrana plasmática. Considerando la ausencia de hiperpolarización y el hecho de que la hiperactivación depende de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , pensamos en la posibilidad de que **en ausencia de SLO3 la hiperpolarización de la membrana plasmática no ocurre y esto evita el gradiente electroquímico y por lo tanto la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del canal de CatSper**, un canal de  $Ca^{2+}$  con papel protagónico en la fisiología del espermatozoide. Decidimos evaluar la hipótesis anterior a través de un método farmacológico: utilizamos procaína y timerosal para aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de dos formas distintas. Brevemente, la procaína 5mM permite que aumente el  $Ca^{2+}$  desde el exterior de la membrana plasmática en tanto el timerosal 100  $\mu\text{M}$  lo hace a través de la liberación de este ion desde reservorios internos. A pesar de que en los estudios de movilidad que hicimos no pudimos detectar cambios significativos en la población de espermatozoides Slo3<sup>-/-</sup> con respecto a los silvestres en cuanto a VCL y ALH, sí existieron cambios en VSL y STR, medidas que también varían cuando el nado es hiperactivado.

Analizamos los datos utilizando distribuciones las cuales representamos en gráficas de violín puesto que en un mismo individuo existen subpoblaciones de espermatozoides que podrían responder diferencialmente a un mismo tratamiento, representar una distribución en una gráfica de violín te permite identificar a estas subpoblaciones y estudiar con mayor detalle las respuesta a determinado tratamiento. A pesar de haber realizado el análisis de esta forma, no encontramos subpoblaciones bien definidas que respondieran diferencialmente ante los

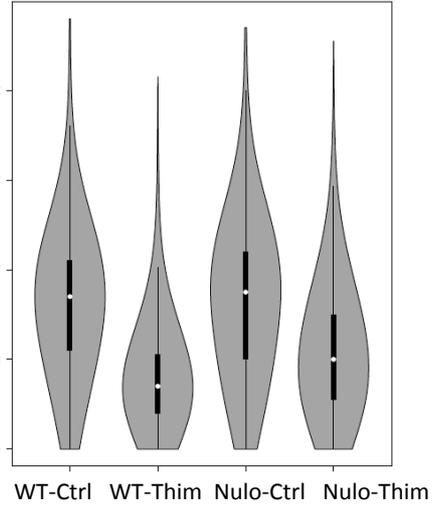
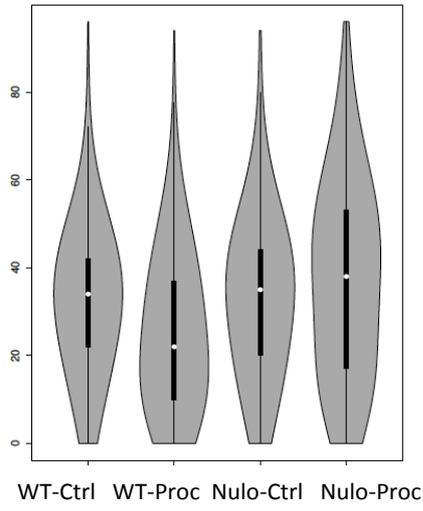
tratamientos, esto se puede observar en los parámetros representados en las gráficas de la Figura 17.

Las distribuciones poblacionales que se muestran en la Figura 17 indican que a diferencia de los espermatozoides SLO3<sup>+/+</sup>, los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> no responden al incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular causado por la procaína, pero sí lo hacen cuando utilizamos timerosal. Revisando a detalle cada uno de los parámetros, encontramos cambios significativos en el caso de dos parámetros: LIN y STR.

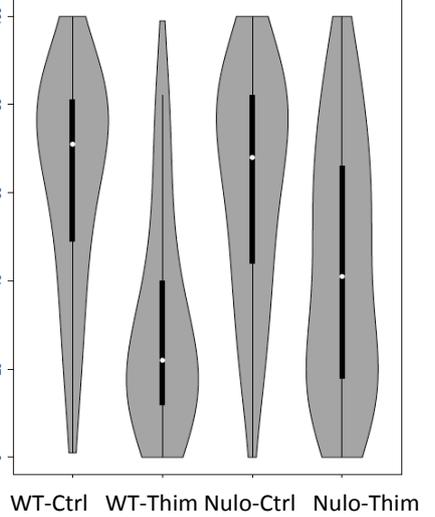
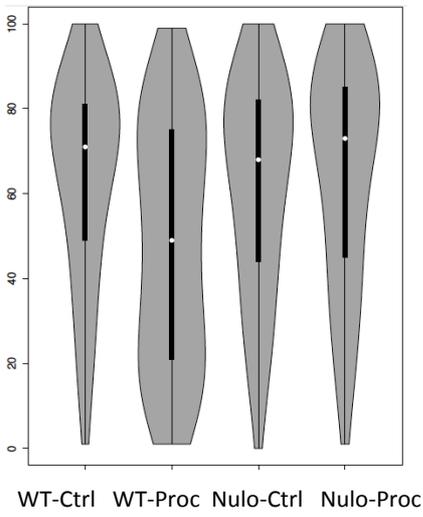
En el caso de STR, tras el tratamiento con procaína, los espermatozoides SLO3<sup>+/+</sup> presentan un decremento significativo de la media poblacional de STR de 64% ± 3.1 a 48% ± 5.2, en contraste, la población de espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> no presentan este cambio. Remarcablemente, tras la adición de timerosal, tanto los espermatozoides SLO3<sup>+/+</sup> como los SLO3<sup>-/-</sup> respondieron de forma significativa, reduciéndose las medias poblacionales de 64% ± 3.1 a 29% ± 1.9, en el caso de espermatozoides silvestres y de 62% ± 1.5 a 43% ± 3.8 en el caso de los nulos. Podemos ver un comportamiento similar en los espermatozoides en el caso de LIN, parámetro que tras la adición de procaína cambia significativamente de 32% ± 1.7 a 25% ± 2.7 en el caso de espermatozoides silvestres en contraste con el caso de los espermatozoides nulos para SLO3, en donde se reduce de 33% ± 1.2 a 37% ± 1.5. En cambio, tras la adición de timerosal, los espermatozoides nulos responden significativamente al igual que los silvestres, cambiando la media poblacional de LIN de 32% ± 1.7 a 16% ± 1 en el caso de SLO3<sup>+/+</sup> y de 33% ± 1.2 a 21% ± 2 en el caso de SLO3<sup>-/-</sup>.

Finalmente, para el caso de VSL el timerosal pero no la procaína provoca un cambio significativo en la media poblacional tanto en espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> como en SLO3<sup>+/+</sup>, tras la adición del timerosal hubo una disminución significativa de VSL, pasando la media de 59 μm/s ± 7.5 a 38 μm/s ± 2.4 en el caso de SLO3<sup>+/+</sup> y de 57 μm/s ± 4.3 a 26 μm/s ± 5.5 en el caso de SLO3<sup>-/-</sup>.

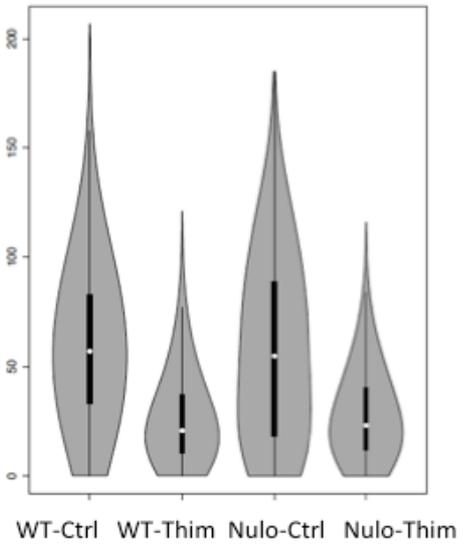
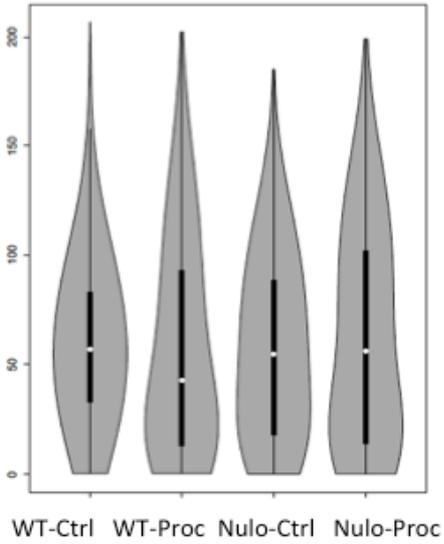
**LIN**



**STR**



**VSL**



**Figura 17. Gráficas de violín de parámetros CASA tras la adición de procaína y timerosal.** El punto blanco central de cada gráfica corresponde a la media de la población de espermatozoides sometida al tratamiento (Control, Procaína y Timerosal). Tras la adición de procaína la media poblacional de ratones silvestres disminuyó en el caso de LIN Y STR, esto no ocurrió en el ratón mutante. Sin embargo al agregar timerosal se observa una disminución significativa en la media poblacional tanto de los espermatozoides pertenecientes a ratones silvestres como a los nulos. (n=10)

## Discusión

### Anormalidades morfológicas en ausencia de SLO3

El hallazgo más importante de los experimentos realizados en esta tesis fue el hecho de que la BSA es el agente que induce las anomalías morfológicas en los espermatozoides del ratón SLO3<sup>-/-</sup>, no el choque hipo-osmótico que ocurre al pasar del epidídimo caudal al medio HS capacitante, como se pensaba al plantear el proyecto en el inicio. Esto implica que la regulación del volumen ocurre correctamente en los primeros minutos en los que los espermatozoides SLO3<sup>-/-</sup> se enfrentan al cambio en la osmolalidad del medio, sin embargo, en presencia de la BSA los mecanismos de RDV parecen presentar una falla debido a la ausencia de SLO3 y esto se ve reflejado en las anomalías morfológicas que prevalecen en los flagelos de los espermatozoides mutantes.

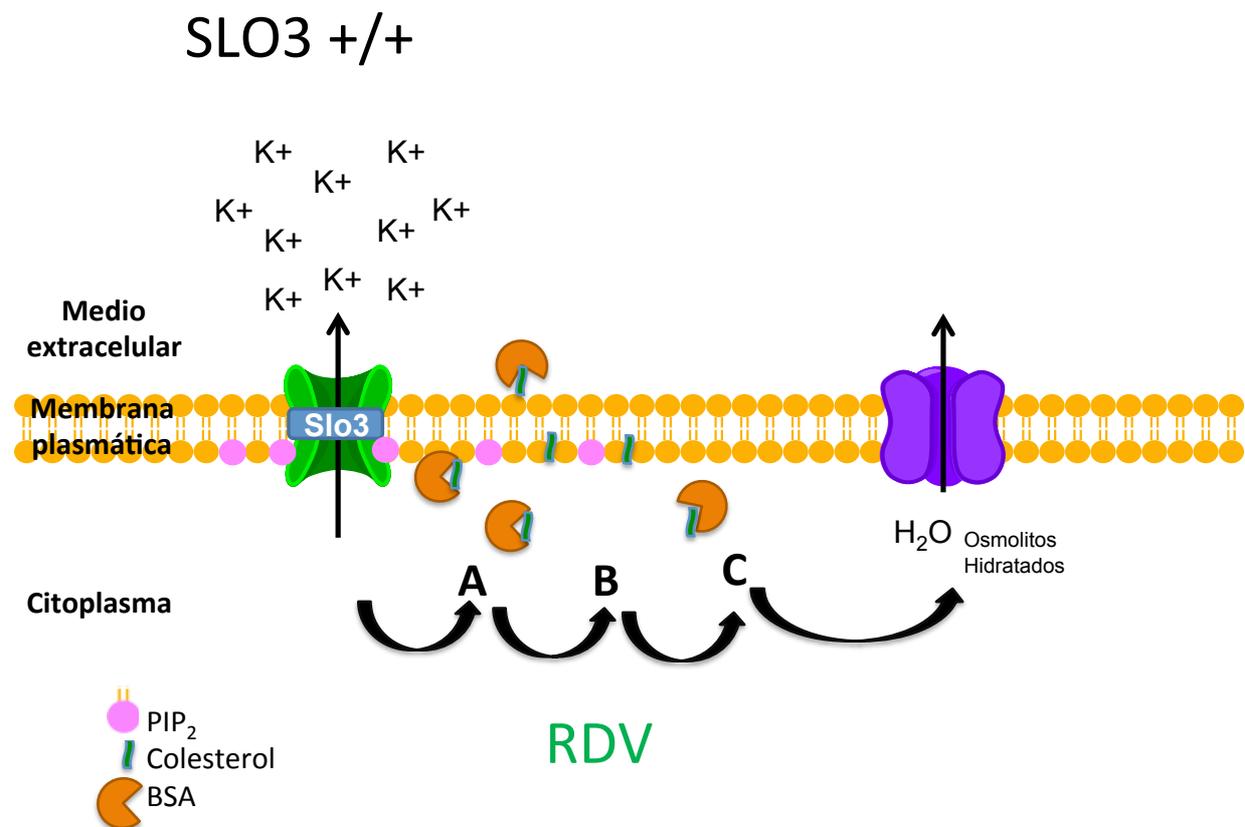
Podemos concluir que el canal SLO3 es un componente auxiliar que cobra protagonismo en la regulación del volumen, tras la interacción de la BSA, u otro aceptor del colesterol, con el espermatozoide. Es decir, su presencia y activación en relación a la regulación del volumen, son importantes para prevenir la deformación flagelar en el momento que a la BSA o a un componente de función análoga como la M-β-CD, interactúa con la membrana plasmática de la célula, pero no antes.

Una manera de relacionar a la BSA, el SLO3 y el proceso de la RDV sería a través del PIP<sub>2</sub>. Se ha reportado que existe una relación inversa entre la cantidad de colesterol presente en la membrana plasmática y el PIP<sub>2</sub> no hidrolizado el cual adquiere una función enlazadora con el citoesqueleto celular (Zhongkui et al., 2012). Ya que el PIP<sub>2</sub> modula a SLO3 evitando su inactivación (Qiong-Yao Tang et al., 2010) se puede hipotetizar que al ser removido el colesterol de la membrana plasmática gracias a la BSA, aumenta la disponibilidad de PIP<sub>2</sub> anclado en la membrana citoplasmática del espermatozoide y al interactuar el componente anterior con el canal SLO3, esto permitiría que el canal se mantenga activo, lo cual a su vez desencadenaría la activación de mecanismos de RDV río abajo, evitando de esta forma que la célula se hinche (Figura 18). Sin embargo, en ausencia de SLO3, los mecanismos río abajo no son capaces de activarse y por lo tanto, tampoco los mecanismos de RDV y en consecuencia las anomalías flagelares se vuelven inminentes.

A pesar de lo expuesto anteriormente, los experimentos realizados en este trabajo no son suficientes para esclarecer los mecanismos moleculares por medio de los cuales la BSA promueve la formación de horquillas en los espermatozoides de ratones nulos. Los experimentos realizados con M-β-CD nos permiten suponer que la remoción del colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides en ausencia del canal SLO3 hacen que estas células sean especialmente sensibles a deformaciones flagelares una vez inmersas en un medio de 330 mmol/kg, pero se requiere realizar otro tipo de pruebas experimentales para

constatar la validez de estos resultados y verificar si el colesterol es uno de los principales factores involucrados, y si el PIP<sub>2</sub> está participando de la forma indicada.

Cabe mencionar que los experimentos realizados son simulaciones *in vitro* de condiciones análogas al tracto genital femenino, por lo que sería de suma importancia realizar pruebas de recuperación *in vivo* de espermatozoides de los ratones SLO3<sup>-/-</sup> con la finalidad de observar si el porcentaje de horquillas y angulaciones flagelares es el mismo al ser expuestas las células al microambiente del tracto genital femenino, esto para certificar que lo observado en el tubo es un fenómeno extrapolable a la realidad y no un artefacto experimental irreplicable *in vivo*.



**Figura 18. Modelo de RDV desencadenado por la activación de SLO3.** La BSA remueve el colesterol de la membrana plasmática aumentando la disponibilidad relativa de PIP<sub>2</sub>, mensajero que permite que SLO3 se mantenga activo, desencadenando esto la activación de otras entidades moleculares que permiten que el mecanismo RDV ocurra correctamente en los ratones silvestres, de tal forma que los flagelos mantengan una morfología funcional

## Conclusiones

### Anormalidades morfológicas en espermatozoides del ratón $Slo3^{-/-}$

Los aceptores del colesterol parecen ser el agente inductor de la anomalía morfológica observada en los espermatozoides  $SLO3^{-/-}$  y espermatozoides en los que  $SLO3$  ha sido bloqueado farmacológicamente.

### Estudio morfológicos y volumétricos de los espermatozoides del ratón $SLO3^{-/-}$ utilizando citometría de flujo

- 1) La rafinosa no es la molécula adecuada para ajustar la osmolalidad y realizar experimentos de citometría de flujo puesto que abate la permeabilidad de colorantes como en el caso del IP.
- 2) No fue posible detectar cambios en el volumen de espermatozoides  $SLO3^{-/-}$  mediante las técnicas de citometría utilizadas.

### Movilidad espermática en el ratón $SLO3^{-/-}$

Los espermatozoides  $SLO3^{-/-}$  son capaces de responder al incremento de  $Ca^{2+}$  cuando éste es liberado por el timerosal desde reservorios internos.

## Referencias

- A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Treviño, “Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa”, *Physiological reviews*, vol. 91, pp. 1305–1355, 2011.
- A. M. Petrunkina, B. Gröpper, A.R. Günzel-Apel and E. Töpfer-Petersen, "Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen”, *Reproduction*, vol. 128, pp. 829-842.
- D.F. Babcock, “Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore” *J Biol Chem*, vol. 258, pp. 6380-6389, 1983.
- C.L. Borg, K.M. Wolski, G. M. Gibbs, and M.K. O' Bryan, “Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a "non-performer"”, *Human reproduction Update*, Mar-Apr. vol. 16, pp. 205-224, 2010.
- C.H. Yeung, J. P. Barfield, T. G. Cooper, “Physiological volume regulation by spermatozoa”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 250, pp.98-105, 2006.
- Q. Chen, H. Peng, L. Lei, Y. Zhang, H. Kuang, Y. Cao, Q.X. Shi, T. Ma and E. Duan, “Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration”, *Cell Res*, vol. 21(6), pp. 922-933, 2010.
- D. Miller and G. C. Ostermeier, “Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa”, *Human Reproduction Update*, vol.12, pp. 757–767, 2006.
- D. Figueiras-Fierro, J.J. Acevedo, P. Martínez-López, J. Escoffier, F.V. Sepúlveda, E. Balderas, G. Orta, P.E. Visconti, A. Darszon “Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm”, *J Cell Physiol*, Mar.vol.228(3), pp.590-601, 2013.
- F. Lang “Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation” *J Am Coll Nutr* Oct vol. 26 pp. 613S-623S, 2007.
- H. J. Cooke, and P. T. K. Saunders, “Mouse models of male infertility”. *Nature reviews. Genetics*. Oct vol. 3(10), pp. 790-801, 2002.
- H. Chang and S. S. Suarez. “Two Distinct Ca<sup>2+</sup> Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice”, *Biology of Reproduction*, Aug vol. 85(2), pp. 296-305, 2011.
- J.P. Barfield, C.H. Yeung and T.G. Cooper “The Effects of Putative K<sup>+</sup> Channel Blockers on Volume Regulation of Murine Spermatozoa”, *Biology of Reproduction*, May vol. 72(5), pp. 1275-81, 2005.
- J. J. Abramson, A. C. Zable, T. G. Favero and G. Salama “Thimerosal Interacts with the CaRelease Channel Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270(50), pp. 29644-29647, 1995.

- M. K. Jungnickel, H. Marrero, L. Birnbaumer, J. R. Lemos and H. M. Florman “Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3”, *Nature Cell Biology*, May vol. 3, pp. 499-502, 2001.
- L. Drevius, H. Eriksson “Osmotic swelling of mammalian spermatozoa”, *Experimental Cell Research*, vol. 42, pp. 136-156, 1966.
- M. R. Curry, J.D. Millar and P.F. Watson “The presence of water channel proteins in ram and human sperm membranes”. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 104, pp. 297-303, 1995.
- M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito and L. Salkoff, “Slo3, a Novel pH-sensitive K<sup>+</sup> Channel from Mammalian Spermatoocytes”. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 3509-3516, 1998.
- M. Eisenbach and L. C. Giojalas. “Sperm guidance in mammals an unpaved road to the egg”, *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. Apr; 7 (4), pp. 276-285, 2006.
- N.L Simmons. “Epithelial Cell Volume Regulation in hypotonic fluids: Studies using a model tissue culture renal epithelial cell system”, *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, vol. 69, pp. 83-95, 1984.
- L. B. Salkoff, A. Butler, G. Ferreira, C. M. Santi and A. Wei , “High-conductance potassium channels of the SLO family” *Nature Reviews Neuroscience*, Dec vol. 7, pp. 921-931, 2006.
- P. Martínez-López, C. M. Santi, C. L. Treviño, A. Y. Ocampo-Gutiérrez, J. J. Acevedo, A. Alisio, L.B. Salkoff, A. Darszon “Mouse sperm K<sup>+</sup> currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels”, *Biochem Biophys Res Commun.* Apr vol. 381, pp. 204-209, 2006.
- Q. Chen, H. Peng, L. Lei, Y. Zhang, H. Kuang, Y. Cao, Q. Shi, T. Ma and E. Duan. “Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration”, *Cell Research*, vol. 21, pp. 922-933, 2011.
- Qiong-Yao Tang, Zhe Zhang, [...], and Diomedes E. Logothetis. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Activates Slo3 Currents and Its Hydrolysis Underlies the Epidermal Growth Factor-induced Current Inhibition. *J.Biol. Chem.* 2010, 285:19259-19266. doi: 10.1074/jbc.M109.100156.
- C. M. Santi, P. Martínez-López, J. L. Vega-Beltrán, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon and L. Salkoff, “The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility”, *FEBS Lett*, Mar vol.584 (5), pp. 1041-1046, 2010.
- Q.Y. Tang, Z. Zhang, X.M. Xia and C. J. Lingle CJ., “Block of mouse Slo1 and Slo3 K<sup>+</sup> channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine”. *Channels (Austin)*, Jan-Feb, vol. 4(1), pp. 22-41, 2010.
- T. G. Cooper, C. H. Yeung, A. Wagenfeld, E. Nieschlag, M. Poutanen, I. Huhtaniemi and P. Sipilä, “Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol.216, pp. 55-63, 2004.
- X.H. Zeng, C. Yang, S. T. Kim, C. J. Lingle, and X. M. Xia. “Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization activated K<sup>+</sup> current in mouse spermatozoa”, *Proc Natl Acad Sci*, Apr 5 vol. 108. Pp. 5879-5884, 2011.

- Y. Zeng, E.N. Clark, and H.M. Florman, “Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion”, *Dev. Biol.*, vol. 171, pp. 554–563, 1995.
- X. Zhang, X. Zeng, X.M. Xia, C. J. Lingle “pH-regulated Slo3 K<sup>+</sup> channels: properties of unitary currents”, *J Gen Physiol*, Sep vol. 128(3), pp. 301-15, 2006.
- Z. Hong, M. C. Staiculescu, P. Hampel, I. Levitan and G. Forgacs “How cholesterol regulates endothelial biomechanics”, *Front. Physiol*, Nov 15, vol. 3, pp. 426, 2012.

Agradecimientos profesionales,

En este trabajo se contó con el apoyo técnico de:

La **I.B.I. Marcela Ramírez Yarza**, técnico académico del Grupo del Dr. Joseph Dubrovsky (IBT, UNAM); de la **M. C. Paulina Torres Rodríguez** y el **M. C. José Luis de la Vega-Beltrán**, técnicos del Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide, del **Dr. Julio César Chávez Zamora** y del **Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera**, técnico del LNMA.

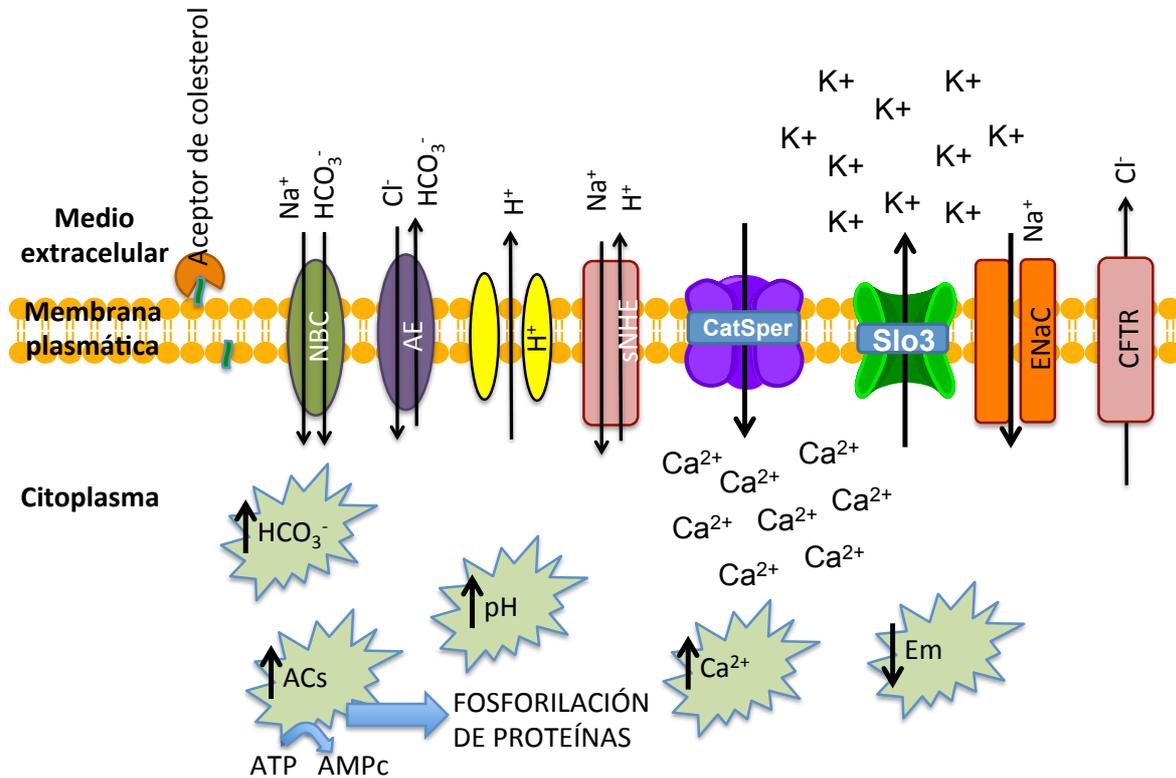
Agradezco a la UNAM por el apoyo recibido a través del programa PAEP.

Esta investigación fue realizada gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico), 128566 ; Dirección General de Asuntos del Personal Académico/ Universidad Nacional Autónoma de México A la (DGAPA/ UNAM) IN202212-3 ; y a la fundación The Alexander von Humboldt Foundation.



## ANEXOS

### ANEXO I: SEÑALIZACIÓN DURANTE LA CAPACITACIÓN



Eventos más importantes que ocurren durante la capacitación: La remoción del colesterol por un aceptor del colesterol, la captación de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) a través del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) y del intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE), el aumento del pH debido a los canales Hv y sNHE. El incremento del  $\text{HCO}_3^-$  activa la sAC que desencadena una serie de eventos que culminan en la fosforilación de proteínas. El aumento en pH puede contribuir a la activación de CatSper permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se esquematizan a los canales SLO3, ENaC y CFTR como posibles participantes durante la hiperpolarización de la membrana plasmática.

