



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE TRES ANÁLOGOS
FOTOACTIVABLES DE PROGESTERONA EN LA
RESPUESTA DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN ESPERMATOZOIDE
DE HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A :

MARTHA ROCÍO SERVÍN VENCES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumna

Servín
Vences
Martha Rocío
56 32 74 28
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
405095607

2. Datos del tutor

Dr.
Takuya
Nishigaki
Shimizu

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alberto
Darszon
Israel

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis Fernando
Covarrubias
Robles

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Claudia Lydia
Treviño
Santa Cruz

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Roberto Carlos
Muñoz
Garay

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de tres análogos fotoactivables de progesterona en la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano.
60 p.
2009

*Para Jorge, Martha y Pau,
que sin su apoyo nada de esto
hubiera sido posible*

I. RESUMEN	8
II. INTRODUCCIÓN	9
1. La fecundación.....	9
1.1 El óvulo.....	9
1.2 El espermatozoide.....	10
2. Los procesos de la fecundación.....	11
2.1 Procesos esenciales del espermatozoide en la fecundación.....	12
a. La capacitación.....	12
b. La movilidad.....	12
c. La reacción acrosomal.....	13
3. Importancia de los flujos iónicos en el espermatozoide.....	14
3.1 Flujos de Calcio.....	15
III. ANTECEDENTES	16
1. La Fecundación de mamífero.....	16
2. Efecto de la progesterona en el espermatozoide de humano.....	16
3. Vía de señalización de la progesterona.....	18
4. Compuestos fotoactivables.....	20
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Medios y reactivos.....	24
2. Material biológico.....	25
2.1 Obtención de la muestra.....	25
2.2 Obtención de espermatozoides móviles por la técnica de <i>swim-up</i>	26
3. Incorporación del colorante Fluo3-AM en espermatozoide de humano.....	27
4. Fluorimetría con espermatozoides cargados con Fluo3.....	27
5. Realización de las curvas dosis-respuesta.....	28
6. Tratamiento de datos.....	28
7. Ensayos de fotólisis.....	30
8. Estimación de la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis.....	31
9. Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ con alta resolución temporal.....	32

VII. RESULTADOS	33
1. Determinación de las curvas dosis-respuesta de: progesterona, P1, P2 y P2'	33
2. Determinación del pulso de luz UV y concentración del análogo fotoactivable.....	35
3. Estimación de la concentración liberada de progesterona.....	43
4. Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ con alta resolución temporal.....	45
VIII. DISCUSIÓN	48
1. Evaluación de los tres análogos de progesterona.....	48
2. Cinética rápida del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona.....	53
IX. CONCLUSIONES	56
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Morfología del óvulo humano.....	9
Figura 2. Morfología del espermatozoide de humano.	10
Figura 3. Proceso general de la fecundación.....	11
Figura 4. Progresión de la RA en un espermatozoide.	14
Figura 5. Esquema del aparato reproductor femenino.	16
Figura 6. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a 3 μ M de progesterona.	18
Figura 7. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un gradiente de progesterona (0-3 μ M).....	18
Figura 8. Modelo de fotoactivación.....	20
Figura 9. Estructura química del grupo fotosensible orto-nitrobenzil.....	22
Tabla 1. Composición del medio para el mantenimiento de espermatozoide de humano (MEH)	24
Figura 10. Estructura química del colorante Fluo3.....	25
Figura 11. Estructura química de los análogos fotoactivable de progesterona (P1, P2 y P2').....	25
Figura 12. Esquema del fluorímetro SLM-8000.....	28
Tabla 2. Compuestos probados, “n” y rango de concentración.....	28
Figura 13. Trazo representativo de progesterona (3 μ M).....	29
Figura 14. Esquema de dos trazos de progesterona.....	29
Tabla 3. Concentraciones y duración de pulsos de luz UV utilizados para la evaluación de las progesteronas fotoactivables.	30
Figura 15. Esquema del fluorímetro SLM-8000 acoplado a una fuente de luz UV.....	31
Figura 16. Curva dosis-respuesta de progesterona en espermatozoides de humano.....	33
Figura 17. Curva dosis-respuesta de P1 y progesterona en espermatozoide de humano.....	34
Figura 18. Curva dosis-respuesta de P2 y progesterona en espermatozoide de humano.....	34
Figura 19. Curva dosis-respuesta de P2' y progesterona en espermatozoide de humano.....	35
Figura 20. Fotólisis de P1 con estimulación de 500 mseg de luz UV.....	36
Figura 21. Fotólisis de P2 con 500 mseg de luz UV.....	37
Figura 22. Fotólisis de P2' con 500 mseg de luz UV.....	37
Figura 23. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la fotoactivación de P1.....	38

Figura 24. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por P2.	38
Figura 25. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por P2'.....	39
Figura 26. t/2 en llegar al pico de distintas concentraciones de los análogos fotoactivables y de la progesterona.....	40
Tabla 4. Amplitud del transiente y t/2 de los análogos de progesterona fotoactivables.....	41
Figura 27. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ de P2' estimulando con 250 mseg de luz UV.....	42
Figura 28. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ de P2' estimulado con 100 mseg de luz UV.....	42
Figura 29. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ de P2' estimulado con 50 mseg de luz UV.....	42
Tabla 5. Valores estimados del porcentaje y de la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis de los análogos de progesterona.....	43
Figura 30. Porcentaje estimado de progesterona liberada con la fotólisis de P2'.....	44
Tabla 6. Estimación del porcentaje y de la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis de P2' con distintos pulsos de luz UV.....	
Tabla 7. Retraso en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ fotoactivando P2' con distintas concentraciones y duraciones del pulso de luz UV.....	45
Figura 31. Cinética del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por P2' (1 μ M) con alta resolución temporal (200 Hz).	46
Figura 32. Estimulación con el análogo P1.....	50
Figura 33. Estimulación con el análogo P2'.....	52

ABREVIATURAS:

[Ca²⁺]_i:	concentración de Ca ²⁺ intracelular
ACs:	adenilato ciclasa soluble
ADN:	ácido desoxiribonucleico
AMPc:	adenosin mono-fosfato cíclico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ARNt:	ácido ribonucleico de transferencia
ATP:	tri-fosfato de adenosin
ATPasa	adenosin trifosfato sintasa
BSA:	albúmina sérica de bovino (<i>bovine serum albumin</i> por sus siglas en inglés)
C20:	carbono 20
C3:	carbono 3
Ca²⁺:	ion calcio
CaCl₂:	cloruro de calcio
Cl⁻:	ion cloro
CO₂:	dióxido de carbono
DMSO:	dimetilsulfóxido
DS:	desviación estándar
EC₅₀:	concentración con la que se obtiene el 50% de respuesta
EGTA:	ácido tetra acético etilen glicol-bis (β.aminoetil éter)
F:	fluorescencia en determinado momento
F₀:	fluorescencia basal
HCO₃⁻:	bicarbonato
HEPES:	ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfónico])
hr:	horas
Hz:	hertz
KCl:	cloruro de potasio
La³⁺:	ion lantano
MEH:	medio de registro para espermatozoide de humano
MgCl₂:	cloruro de magnesio
min:	minutos
ml:	mililitros
mM:	milimolar
mseg:	milisegundos

n:	número de repeticiones
Na⁺:	ion sodio
NaCl:	cloruro de sodio
NaHCO₃:	bicarbonato de sodio
Ni²⁺:	ion níquel
nM:	nanomolar
NPE:	nitrofeniletil
P1:	progesterona fotoactivable modificada en el C3 y C20
P2:	progesterona fotoactivable modificada en el C3
P2':	progesterona fotoactivable modificada en el C20
pH_i:	potencial de hidrógeno intracelular
PIP₂:	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA:	proteína cinasa A
PKC:	proteína cinasa C
PLC:	fosfolipasa C
RA:	reacción acrosomal
rpm:	revoluciones por minuto
seg:	segundos
t/2:	mitad de tiempo en llegar al punto máximo
TRP:	receptor de potencial transitorio
UV:	luz ultravioleta
VOCC_T:	canal de calcio operado por voltaje tipo T
λ_{em}:	longitud de onda de emisión
λ_{ex}:	longitud de onda de excitación
μL:	microlitros
μM:	micromolar

I. RESUMEN

La fecundación es un evento de gran importancia para los organismos de reproducción sexual, ya que permite la permanencia de las especies. En los mamíferos, este evento ocurre en el tracto reproductor femenino, donde el espermatozoide pasa por una serie de cambios fisiológicos que le permitirán fecundar al óvulo. Un ejemplo es el efecto de la progesterona para modular la movilidad y facilitar la reacción acrosomal (RA) con el fin de ayudar al espermatozoide a atravesar las capas externas de óvulo y así fecundarlo. El efecto fisiológico más estudiado de progesterona es un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el espermatozoide, el cual tiene una estrecha relación con la modulación de la movilidad y la RA. Para poder estudiar de manera más fina la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por este esteroide, desarrollamos en colaboración con un grupo japonés, tres análogos fotoactivables de progesterona (P1, P2 y P2'). Los compuestos fotoactivables son moléculas modificadas químicamente con un grupo fotosensible, por lo que su actividad biológica está reducida hasta que por la irradiación con luz UV se libera el grupo fotosensible. Los compuestos fotoactivables útiles deben que cumplir los siguientes requisitos: 1) actividad biológica reducida; 2) alta eficiencia de fotólisis. Por lo que el objetivo de este trabajo fue la evaluación de los parámetros anteriores. Para esto, se realizó fluorimetría con espermatozoides de humano previamente cargados con un colorante fluorescente para Ca^{2+} (Fluo3). Con este método se conoció la actividad basal, es decir, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que inducen los análogos de progesterona sin fotoactivar. Posteriormente se determinó la eficiencia de fotólisis aplicando pulsos de luz UV con distinta duración para inducir el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El análogo P1 (con dos modificaciones con el grupo fotosensible nitrobenzil en el C3 y C20 de la progesterona) fue el análogo con la actividad basal más baja ($1 < 1/1000$), sin embargo la fotólisis no fue eficiente. Con P2 (con una modificación en el C3) se disminuyó la actividad respecto a progesterona 13 veces y la fotólisis no fue eficiente; además se encontraron productos secundarios inespecíficos después de la fotólisis. Este problema se presentó tanto para P2 como para P1. Por otro lado, P2' (con modificación en el C3) disminuyó su actividad respecto a progesterona solamente 8 veces, sin embargo fue el análogo con la fotólisis más eficiente. Considerando lo anterior, P2' fue el mejor análogo fotoactivable de progesterona a pesar de la baja reducción de la actividad basal. Una vez terminada la evaluación se utilizó el análogo elegido (P2') en ensayos de alta resolución temporal (200 Hz). Lo que se observó fue el tiempo que transcurre antes del incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (~800 mseg). El valor obtenido en este trabajo indica que no hay una acción directa de la progesterona sobre el canal de Ca^{2+} , lo que sugiere que hay una vía de señalización previa a la apertura de este canal, hasta la fecha desconocido.

II. INTRODUCCIÓN

1. La fecundación

La fecundación es un evento de vital importancia en los organismos de reproducción sexual, en la cual el gameto femenino (óvulo) y el gameto masculino (espermatozoide), se fusionan para comenzar el desarrollo de un nuevo individuo con carga genética diferente a la de los padres (Yanagimachi, 1994). La reproducción sexual se encuentra presente en todas las ramas del árbol filogenético de los organismos multicelulares, lo cual indica ventajas evolutivas -como el incremento en la tasa de adaptación de las poblaciones gracias a la recombinación (Butlin, 2002).

1.1 El óvulo

El óvulo es la célula sexual femenina (**Figura 1**), la cual contiene una gran cantidad de citoplasma, particularmente, el óvulo humano mide ~100 μm . En esta célula se encuentran proteínas, ribosomas, ARNt, ARNm, factores morfogenéticos y todos los elementos necesarios para formar un nuevo individuo después de la fecundación (Gilbert, 2006).

El óvulo humano está cubierto por una capa extracelular llamada zona pelúcida, la cual está constituida por glicoproteínas y rodeada por células foliculares (células del cúmulus) que forman la capa de la corona radiada. El óvulo posee un núcleo (haploide), un nucléolo, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gránulos corticales (Gilbert, 2006; Wassarman and Albertini, 1994).

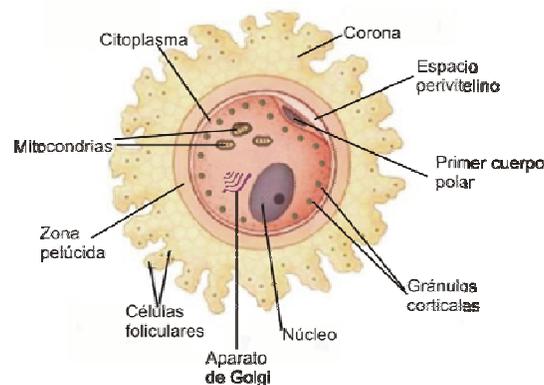


Figura 1. Morfología del óvulo humano. Se muestran los organelos celulares que componen al gameto femenino, así como sus capas extracelulares.

1.2 El espermatozoide

La célula sexual masculina es el espermatozoide, el cual se constituye principalmente, por cabeza y flagelo (o cola). La forma y la función de esta célula son altamente especializadas para cumplir su único objetivo: llevar la información genética al óvulo. En la cabeza (2-5 μm de diámetro) se encuentra un núcleo haploide con ADN sumamente compacto. Por arriba del núcleo se encuentra la vesícula acrosomal o acrosoma, que contiene enzimas hidrolíticas y proteínas importantes para la fusión con el óvulo. En el espermatozoide de mamíferos, debajo del núcleo se encuentra la envoltura nuclear redundante, que es un conjunto de vesículas membranosas originadas a partir de la envoltura nuclear durante la espermiogénesis (Suarez, 2008). Debido a que el espermatozoide no tiene retículo endoplásmico se considera que la envoltura nuclear redundante, junto con el acrosoma, juegan un papel importante como reservorio de Ca^{2+} intracelular (**Figura 2**).

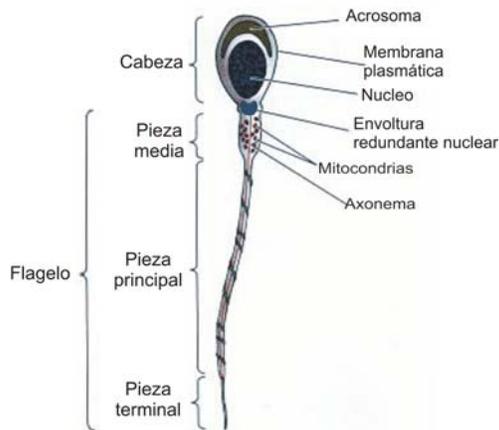


Figura 2. Morfología del espermatozoide de humano. Se muestran los segmentos y organelos principales del gameto masculino. Modificado de (Gilbert, 2006).

El flagelo del espermatozoide, que varía de longitud dependiendo de la especie (en particular el de humano mide $\sim 55 \mu\text{m}$), está formado principalmente por el axonema, que es la maquinaria de propulsión para el espermatozoide. El axonema posee dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos asociados con dineínas. Las dineínas son ATPasas que funcionan como motores moleculares – por ejemplo: la miosina y la cinesina- para producir la fuerza motriz que impulsa al flagelo. El flagelo del espermatozoide se divide en pieza media, principal y terminal (**Figura 2**). En la pieza media, el axonema está rodeado por mitocondrias en un arreglo espiral, característico en mamíferos. En la pieza principal, el axonema está cubierto por dos tipos de citoesqueleto: la fibra densa externa (*outer dense fibres*) y la vaina fibrosa

(*fibrous sheath*). En la pieza terminal no se encuentran estos tipos de citoesqueleto ni mitocondrias. Otra característica del espermatozoide es que posee muy poco citoplasma y no sintetiza proteínas ni ácidos nucleicos (Darszon et al., 2005; Eddy and O'brian, 1994; Gilbert, 2006; Yanagimachi, 1994). Sin embargo es capaz de fecundar al óvulo respondiendo de forma dinámica a los cambios que encuentra dentro del tracto reproductor femenino.

2. Los procesos de la fecundación

La fecundación es un evento altamente regulado que involucra el reconocimiento entre ambos gametos, así como la capacidad de responder ante su ambiente. Se puede dividir en varios procesos particulares con relación al espermatozoide: 1) Activación de la movilidad; 2) Quimiotaxis (en algunas especies); 3) Hiperactivación (en mamíferos); 4) Unión a la capa externa del óvulo; 5) Reacción acrosomal (RA); 6) Penetración a la capa externa del óvulo; 7) Fusión de las membranas plasmáticas entre el espermatozoide y el óvulo; 8) Activación del óvulo, que incluye la reacción cortical, es decir, la exocitosis de los gránulos corticales y 9) Fusión de los pronúcleos (**Figura 3**).

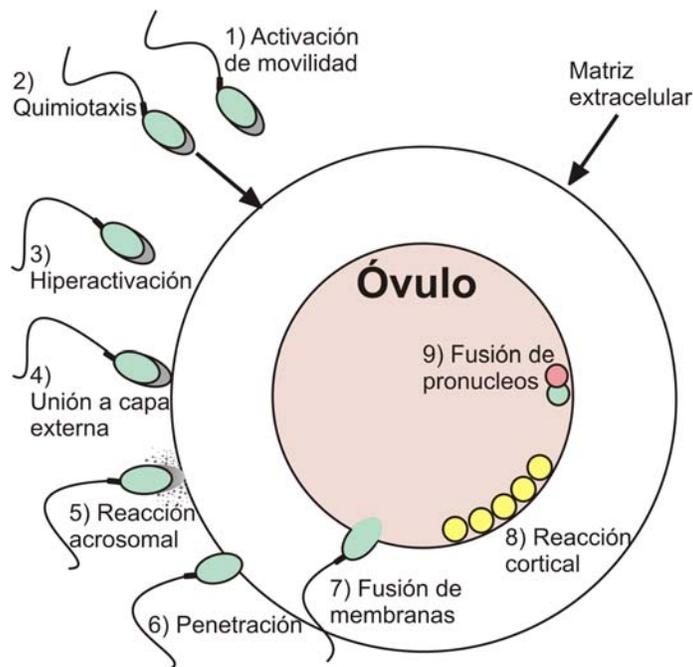


Figura 3. Proceso general de la fecundación. Se muestran los pasos para la adecuada interacción entre el óvulo y el espermatozoide, y así lograr la fecundación. Este esquema es válido tanto para mamíferos como para otros organismos, aunque se pueden necesitar otros procesos o carecer de ellos.

2.1 Procesos esenciales del espermatozoide en la fecundación

El espermatozoide de mamífero adquiere la habilidad para fecundar al óvulo después de pasar por una serie de cambios fisiológicos en el tracto reproductor femenino. Tales cambios son: la capacitación, modulación de la movilidad y la RA.

En la regulación de estos eventos, los flujos y canales iónicos juegan un papel fundamental (Darszon *et al.*, 2005).

a. La capacitación

En mamíferos, el espermatozoide recién eyaculado no posee la capacidad de fecundar al óvulo, ésta la adquiere durante su recorrido por el tracto reproductor femenino. Este fenómeno, conocido como capacitación, engloba una serie compleja de eventos moleculares que aún no se han logrado dilucidar por completo. Algunos de los eventos ya identificados durante este proceso son: 1) remoción de colesterol de la membrana plasmática, que cambia sus propiedades (Visconti *et al.*, 2002), 2) fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, mediada por la proteína cinasa A (PKA) (Darszon *et al.*, 2006), 3) hiperpolarización de la membrana plasmática en el espermatozoide de ratón 4) incremento del pH intracelular (pH_i) (Darszon *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2002).

Los eventos ocurridos durante la capacitación son necesarios para la inducción de la RA y de la hiperactivación (Visconti *et al.*, 2002). Además, la capacitación es indispensable para que exista la fecundación. Aunque debido a la dificultad de identificar a los espermatozoides capacitados de los no capacitados, se considera que un espermatozoide está capacitado cuando responde a los estímulos fisiológicos que inducen la RA (Darszon *et al.*, 2006).

La capacitación se puede reproducir *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contenga Ca²⁺, HCO₃⁻ y albúmina sérica de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (Darszon *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2002).

b. La movilidad

Los espermatozoides de mamífero no tienen capacidad para nadar cuando están en el testículo, esta propiedad la adquieren durante un proceso de maduración en el epidídimo y el movimiento comienza al momento de la eyaculación. Posteriormente, en el tracto reproductor femenino, el espermatozoide presenta dos tipos de movilidad: la activada y la hiperactivada. La primera se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de amplitud corta (Darszon *et al.*,

2005; Darszon *et al.*, 2007; Turner, 2006). Al entrar al tracto reproductor femenino este tipo de movilidad impulsa a los espermatozoides con un nado progresivo (Turner, 2006). Por otro lado, se encuentra la movilidad hiperactivada, que se ha observado en espermatozoides recuperados del oviducto, donde ocurre la fecundación. Cuando estos espermatozoides se colocan en un medio no viscoso, las células presentan un fuerte batido flagelar con una marcada asimetría y una mayor amplitud respecto a la observada en los espermatozoides activados (Suarez, 1996; Suarez *et al.*, 1991). Este tipo de movilidad permite que el espermatozoide nade en un medio viscoso -como lo es el oviducto y la región cercana al óvulo- de manera progresiva (Ho and Suarez, 2003). La hiperactivación es regulada por Ca^{2+} , elemento necesario tanto para el inicio como para el mantenimiento de este tipo de movilidad (Darszon *et al.*, 2006; Yanagimachi, 1994).

c. La reacción acrosomal

La RA es esencial en la fecundación de mamíferos. Este proceso consiste en la exocitosis del acrosoma, una vesícula que cubre la parte superior del núcleo y que contiene diversas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina. En contraste con la exocitosis neuronal, la RA es un evento único. En este proceso hay una fusión de membranas en múltiples puntos en la cual se liberan, junto con contenidos del acrosoma, vesículas híbridas formadas de la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (**Figura 4**) (Yanagimachi, 1994). Por lo anterior, después de la RA, la cabeza del espermatozoide se adelgaza y podría cortar la zona pelúcida mecánicamente. La RA cumple con dos funciones para la fecundación: facilitar la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida y exponer a la membrana interna del acrosoma, que posee sitios de reconocimiento para la fusión óvulo-espermatozoide (Harper *et al.*, 2008). Por estas razones, en los mamíferos, la RA es un evento indispensable para la fecundación.

La RA se induce por la unión del espermatozoide con distintos agonistas como la zona pelúcida (Kirkman-Brown *et al.*, 2002; Wassarman, 2005) y la progesterona (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2002), que son los inductores más estudiados hasta el momento. Se sabe que ambos agonistas

aumentan la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), pero las vías de señalización aún se están estudiando.

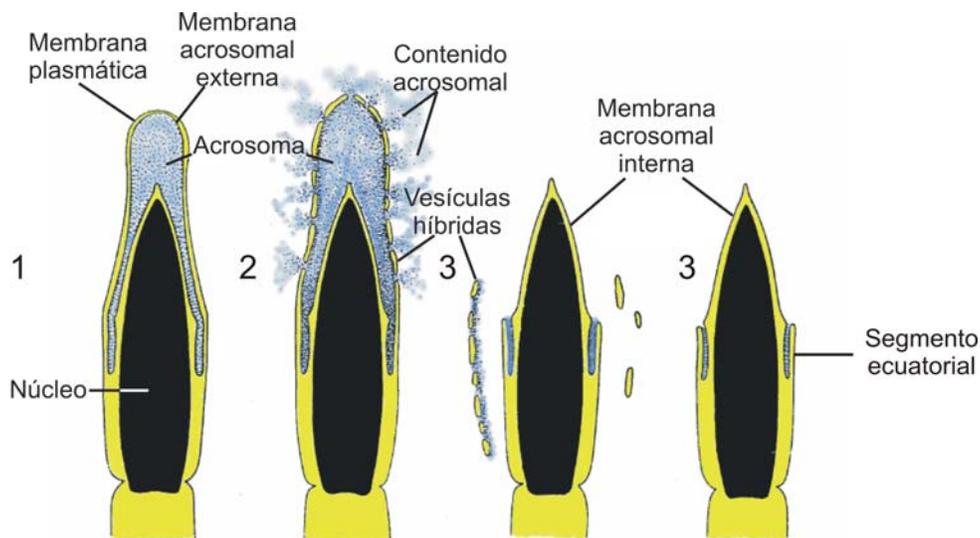


Figura 4. Progresión de la RA en un espermatozoide. Se muestra la cabeza antes (1), durante (2) y después de la RA (3). Modificado de (Yanagimachi, 1994).

3. Importancia de los flujos iónicos en el espermatozoide

El espermatozoide no puede sintetizar proteínas, en cambio, posee la habilidad de responder a su ambiente gracias a que posee una gran variedad de canales iónicos, los cuales le permiten intercambiar información con su ambiente de manera rápida. Como ya se ha mencionado, los flujos iónicos son necesarios para que se lleven a cabo los procesos necesarios para la fecundación (como capacitación, RA y modulación de la movilidad).

Se sabe que la capacitación depende de Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , Na^+ y BSA en un medio *in vitro*, pero no se conocen las entidades moleculares que se encargan de regular el potencial de membrana, el pH_i y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que cambian durante este proceso. Sin embargo, se ha propuesto que la hiperpolarización es necesaria para remover la inactivación de los canales Ca_v tipo T, dejándolos así en un estado cerrado y listos para abrirse en respuesta a la zona pelúcida para inducir la RA (Darszon *et al.*, 2007).

Por otro lado, respecto a la movilidad se ha propuesto una clase de canales de Ca^{2+} , los CatSpers, regulan este proceso. Estos canales se expresan en los

testículos y se conocen cuatro miembros de esta familia. Los ratones nulos del *catsper1* y *catsper2* son infértiles debido a que no son capaces de hiperactivarse (Darszon *et al.*, 2007).

3.1 Flujos de calcio

El Ca^{2+} es un segundo mensajero de gran importancia en procesos de señalización celular y el espermatozoide no es una excepción, ya que el Ca^{2+} regula distintos procesos y funciona como señal fundamental en la fisiología del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006).

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está regulada directamente por transportadores membranales localizados tanto en la membrana plasmática como en los organelos membranosos. En general, el citoplasma de las células en reposo contiene ~100 nM de Ca^{2+} “libre”, mientras que del lado extracelular encontramos ~1 mM de Ca^{2+} , lo que es miles de veces mayor que la concentración intracelular. Esta gran diferencia entre el lado extracelular e intracelular se utiliza como fuerza motriz para eventos de señalización (Darszon *et al.*, 2005). Para generar y mantener el gradiente de Ca^{2+} , las células poseen varias ATPasas e intercambiadores ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) que se encargan de mover iones Ca^{2+} en contra del gradiente (Darszon *et al.*, 2005).

En espermatozoides de ratón y humano se ha demostrado la expresión de diversos canales de Ca^{2+} que se encuentran localizados diferencialmente. Por ejemplo: Ca_v , CNG, TRPs, CatSpers. Lo anterior sugiere un enorme potencial del espermatozoide para responder a diversos estímulos fisicoquímicos (Darszon *et al.*, 2005).

III. ANTECEDENTES

1. La fecundación de mamífero

La fecundación en mamíferos es interna, es decir, se lleva a cabo en el tracto reproductor femenino, la cual es una estructura morfológicamente complicada, cuyo ambiente cambia dinámicamente dependiendo de la fase del ciclo menstrual. Ya que la fecundación es interna y los espermatozoides se enfrentan a una serie de cambios fisiológicos, es difícil conocer todos los eventos que ocurren durante este proceso *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, el óvulo de mamífero se encuentra cubierto por la zona pelúcida y por un conjunto de células foliculares conocidas como el *cumulus oophorus*. El cúmulus se compone de células arregladas de manera radial y de los compuestos que secretan, generando así una matriz extracelular (**Figura 5**). Las células del cúmulus sintetizan y secretan progesterona, así como prostaglandinas durante y después del periodo de ovulación (Osman et al., 1989; Thomas and Meizel, 1989; Yanagimachi, 1994).

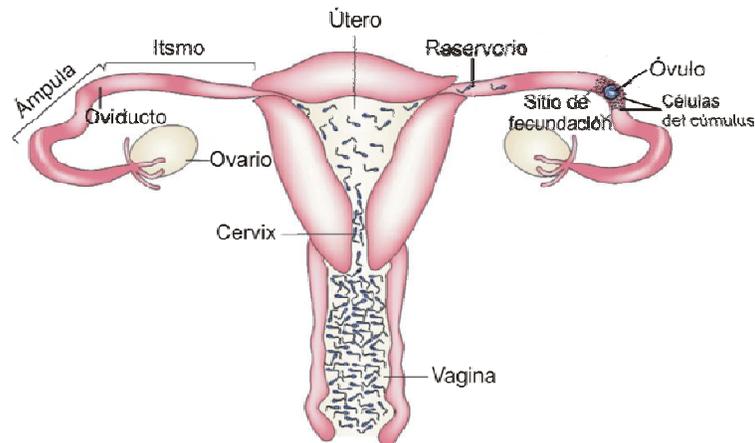


Figura 5. Esquema del aparato reproductor femenino. Se muestran las distintas regiones del sistema reproductor femenino, así como el lugar donde se lleva a cabo la fecundación, el óvulo y las células del cúmulus. Modificado de (kaupp *et al.*, 2007).

2. Efecto de la progesterona en el espermatozoide de humano

La progesterona es una hormona esteroidea, que entre otras funciones, regula el ciclo menstrual femenino en conjunto con otras hormonas. Además de

esta función, la progesterona induce diversas respuestas de gran importancia en el espermatozoide de humano, ya que a concentraciones micromolares promueve la RA (Blackmore *et al.*, 1990; Osman *et al.*, 1989) y la hiperactivación (Jaiswal *et al.*, 1999; Suarez *et al.*, 1991). En cambio, en concentraciones picomolares es un compuesto quimioatrayente para el espermatozoide de humano (Jaiswal *et al.*, 1999; Teves *et al.*, 2006) y de conejo (Guidobaldi *et al.*, 2008).

Entre las respuestas que induce la progesterona en el espermatozoide, se encuentra un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, una depolarización en el potencial de membrana (Foresta *et al.*, 1993), salida de Cl^- de la célula (Turner and Meizel, 1995), entrada de Na^+ (Foresta *et al.*, 1993), hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) (Thomas and Meizel, 1989) y fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas (Tesarik *et al.*, 1993).

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona es una de las respuestas más estudiadas y como ya se mencionó, su efecto es distinto dependiendo de la concentración de esta hormona (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Blackmore, 1993; Guidobaldi *et al.*, 2008; Kirkman-Brown *et al.*, 2000; Thomas and Meizel, 1989).

A 3 μM , la progesterona induce en el espermatozoide de humano un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que muestra un componente transitorio seguido de uno sostenido (**Figura 6**) (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). El aumento transitorio inicia en la pieza media, tarda ~ 1 min en llegar al pico y disminuye en el mismo tiempo (Blackmore *et al.*, 1990; Harper *et al.*, 2003; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). Esta entrada se elimina con bloqueadores de canales de Ca^{2+} , como La^{3+} y Ni^{2+} (en concentración μM) (Blackmore, 1993; Blackmore *et al.*, 1990), así como removiendo todo el Ca^{2+} extracelular con un quelante de Ca^{2+} , como EGTA (Bedu-Addo *et al.*, 2007; Blackmore *et al.*, 1990). Lo anterior indica que la progesterona provoca la entrada de Ca^{2+} extracelular. Asociado al componente transitorio, existe un menor incremento correspondiente al Ca^{2+} liberado de pozas internas (Bedu-Addo *et al.*, 2007). Por otro lado, la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ sostenida se observa después de la entrada de la transitoria y dura más de 20 minutos (Harper *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2004; Kirkman-Brown *et al.*, 2000).

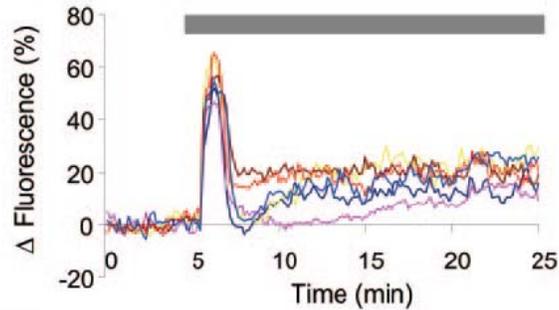


Figura 6. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a 3 μM de progesterona. Se observa el aumento transitorio, que comienza con la adición de progesterona (barra gris), seguido del sostenido. Cada color indica el cambio de fluorescencia del indicador de Ca^{2+} en un espermatozoide de humano. Tomado de (Harper *et al.*, 2004).

Por otra parte, cuando la progesterona se añade en forma de gradiente, la célula responde de manera muy distinta comparando con el estímulo micromolar antes descrito. En el gradiente se produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en forma de rampa (**Figura 7**). Este aumento se detecta después de 1 min del estímulo y llega a su máximo antes de terminar la adición del gradiente. Posteriormente la $[Ca^{2+}]_i$ se estabiliza y comienza a decaer lentamente (Harper *et al.*, 2004). Este tipo de estímulo gradual induce oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en un porcentaje (~30%) de la población de espermatozoides, las cuales son asociadas con cambios en el batido flagelar (Harper *et al.*, 2004).

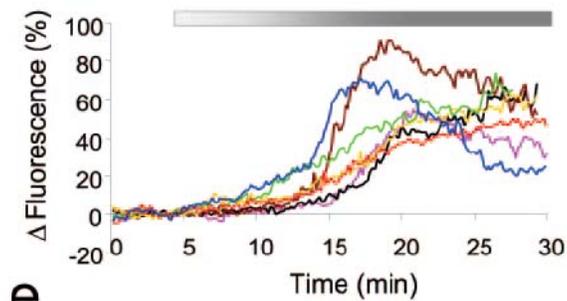


Figura 7. Aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un gradiente de progesterona (0-3 μM). Se observa el aumento de Ca^{2+} en forma de rampa. Cada color indica el cambio de fluorescencia del indicador de Ca^{2+} en un espermatozoide de humano. Tomado de (Harper *et al.*, 2004).

3. Vía de señalización de la progesterona

En el espermatozoide de humano se han descrito dos tipos de receptores para progesterona. Existen tanto receptores nucleares (clásicos) como receptores en la membrana plasmática (Losel *et al.*, 2005). Este último receptor se encontró al conjugar la progesterona con BSA (una molécula incapaz de atravesar la

membrana plasmática). Aún con esta modificación la progesterona es capaz de inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Blackmore *et al.*, 1991). Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado dilucidar la identidad molecular del receptor de progesterona en el espermatozoide de humano.

No se sabe si el receptor de progesterona se encuentra acoplado directamente a un canal o induce su apertura a través de alguna vía de señalización. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por este esteroide es insensible a la toxina de pertusis, lo que sugiere que una proteína tipo G_i clásica no participa en este proceso (Blackmore, 1993). Aunque al considerar que se activa la vía de fosfolipasa C (PLC) y de la proteína cinasa C (PKC) (Foresta *et al.*, 1995), no se puede descartar que otro tipo de proteína G pueda estar involucrada.

A pesar de la controversia respecto a las proteínas participantes en la vía de señalización de progesterona, inicialmente se propuso que un canal de Ca^{2+} operado por voltaje tipo T ($VOCC_T$) podría ser el responsable de la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la progesterona (Garcia and Meizel, 1999). Sin embargo, en 1999 se encontraron evidencias que demuestran lo contrario (Blackmore and Eisoldt, 1999) y en el año 2003, se encontró evidencia farmacológica que asocia a este canal con el componente sostenido del aumento de Ca^{2+} , así como en la RA (Kirkman-Brown *et al.*, 2003). Un año más tarde, se propuso a los canales de la familia TRP (receptor de potencial transitorio) como otros candidatos del incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por progesterona (Guzman-Grenfell and Gonzalez-Martinez, 2004).

Otro efecto que produce esta hormona es la entrada de Na^+ , la cual también puede ser responsable de la depolarización de la membrana (Foresta *et al.*, 1993). Así mismo, el estímulo con progesterona induce la salida de Cl^- , mediado posiblemente a través de un canal de Cl^- tipo $GABA_A$ (Meizel *et al.*, 1997; Sabeur *et al.*, 1996; Turner and Meizel, 1995; Wistrom and Meizel, 1993).

A pesar de toda la evidencia farmacológica recabada hasta la fecha, no se ha logrado dilucidar la cascada de señalización inducida por progesterona para activar la RA o la hiperactivación. Tampoco se han logrado identificar los canales que participan en esta(s) vía(s) de señalización. Por lo que es importante contar

con herramientas que nos permitan analizar de manera mas detallada los efectos inducidos por la progesterona en espermatozoide de humano, por ejemplo, los compuestos fotoactivables, particularmente, la progesterona fotoactivable que seria de gran utilidad para dilucidar el papel de la progesterona en la movilidad del espermatozoide de humano.

4. Compuestos fotoactivables

Los compuestos fotoactivables o enjaulados son moléculas modificadas químicamente con un grupo fotosensible (Ellis-Davies, 2007; Mayer and Heckel, 2006). Al usar estos compuesto en un contexto biológico -es decir, modificando una molécula biológicamente activa con un grupo fotosensible- su actividad debe ser mínima, ya que la modificación le impide interactuar con su blanco. Cuando los compuestos fotoactivables son irradiados con un pulso de luz UV, el grupo fotosensible se libera (**Figura 8**). Entonces, los compuestos quedan en su forma original, por lo que ahora son capaces de inducir algún proceso biológico en la célula (Ellis-Davies, 2007; Mayer and Heckel, 2006).

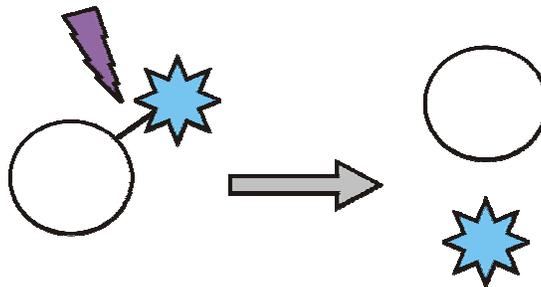


Figura 8. Modelo de fotoactivación. La molécula en estudio (círculo blanco) se inactiva mediante la adición de un grupo fotosensible (estrella azul), que impide su actividad biológica. Cuando el compuesto inactivo es estimulado con un pulso de luz UV (rayo morado), el grupo fotosensible es liberado y la molécula puede actuar como lo haría en su contexto biológico.

Una ventaja de los compuestos fotoactivables es que se puede manipular el sitio y la forma de liberación de la molécula fotoactivable (en microscopia) dependiendo de la forma de iluminación con la luz UV. Por ejemplo, con una iluminación uniforme se puede liberar la molécula en una área grande (como todo el campo visual), mientras que con una iluminación local se puede liberar en un punto particular (Ellis-Davies, 2007).

Por otro lado, en muchos estudios de microscopía, los compuestos son adicionados con una pipeta de manera manual, lo que provoca artefactos de movimiento en las células. Por lo que otra ventaja de los compuestos fotoactivables es que permiten un comienzo limpio del proceso que se quiere estudiar, es decir, no hay alteraciones que puedan confundir el inicio de la respuesta con algún artefacto de movimiento (Mayer and Heckel, 2006). Sin embargo, para células inmovilizadas, existen sistemas de micro-perfusión como el *picospritzer*, el cual es útil para controlar el momento y la duración de un estímulo biológico cerca de la punta de micropipetta. Sin embargo, este dispositivo no se puede usar con células no-inmovilizadas, como espermatozoides que nadan libremente.

Otra ventaja importante es la resolución temporal que se puede adquirir. Como ya se mencionó, con el uso de sustancias convencionales (no fotoactivables), al añadir el compuesto con una pipeta o con un micro-inyector, éste tarda un tiempo en difundir, lo que hace difícil resolver con precisión el inicio de la respuesta. En cambio con los compuestos fotoactivables, uno puede elegir el momento de inicio del estímulo y es posible resolver cinéticas rápidas exclusivas de la acción del compuesto, incluso en el orden de milisegundos.

El compuesto fotosensible ideal debe ser inactivo antes de la fotólisis, es decir, el compuesto no debe ser ni antagonista ni agonista (Ellis-Davies, 2007). La tasa de liberación del compuesto necesita ser más rápida que el proceso en estudio (Ellis-Davies, 2007), es decir, la conversión del compuesto fotoactivable en un compuesto activo debe ser más rápida que el fenómeno en el que uno está interesado. Por último, la eficiencia de la fotólisis debe ser lo más alta posible, ya que la irradiación prolongada de la luz UV tiene efectos dañinos en las células y puede causar artefactos en las respuestas analizadas. La eficiencia de fotólisis es proporcionada por el coeficiente de extinción y rendimiento cuántico.

El primer compuesto fotoactivable reportado fue el trifosfato de adenosin (ATP) (Kaplan *et al.*, 1978). En la actualidad hay más ejemplos de moléculas enjauladas o fotosensibles tales como: el Ca^{2+} (Ellis-Davies, 2003), algunos neurotransmisores (Milburn *et al.*, 1989; Wieboldt *et al.*, 1994), inositoles (Walker *et al.*, 1987), nucleótidos (Kaplan *et al.*, 1978), esteroides (Lin *et al.*, 2002),

péptidos (Walker *et al.*, 1998), enzimas (Marriott, 1994), otras proteínas como PKA (Zou *et al.*, 2002), DNA (Monroe *et al.*, 1999), mRNA (Ando *et al.*, 2001), entre otros.

Para la síntesis de los compuestos fotoactivables se utilizan diversos grupos químicos fotosensibles. El grupo fotosensible más común es el orto-nitrobenzil (**Figura 9**) con todos sus derivados. La velocidad de fotólisis de este grupo y sus derivados esta en el rango de microsegundos. Una desventaja del grupo nitrobenzil es que se forma un producto secundario después de la fotólisis: el nitrosoaldehído, el cual puede ser dañino en un contexto biológico. Por otro lado, existen derivados del nitrobenzil, como el nitrofeniletil (NPE) que después de la fotólisis se desprende una nitroacetona, una molécula menos dañina que el nitrosoaldehído. (Mayer and Heckel, 2006).

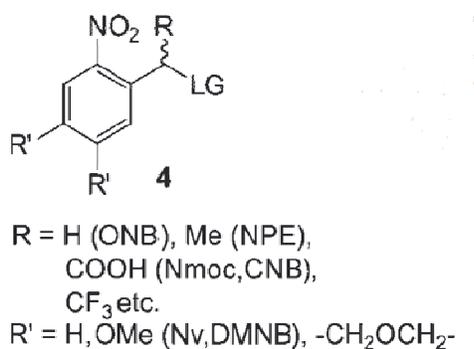


Figura 9. Estructura química del grupo fotosensible orto-nitrobenzil. R y R' son distintos grupos intercambiables, que le dan diferentes características al grupo fotoactivable; en paréntesis la abreviatura del nombre del grupo fotosensible. LG: grupo liberado (*leaving group*). Tomado de (Mayer and Heckel, 2006).

Otro grupo fotosensible comúnmente utilizado es la cumarina y sus derivados, el cual tiene una eficiencia de liberación en la escala de nanosegundos, sin embargo, es mas sensible a la luz que el grupo nitrobenzil y el grupo liberado es fluorescente (Mayer and Heckel, 2006).

IV. HIPÓTESIS

El análogo fotoactivable de progesterona posee actividad basal mínima respecto a la natural y su liberación permitirá realizar mediciones de alta resolución temporal de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los análogos de progesterona fotoactivable (P1, P2, P2') para realizar mediciones de alta resolución temporal de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano.

Objetivos específicos

- ☉ Determinar la actividad basal de los 3 análogos de progesterona fotoactivable en espermatozoide de humano.
- ☉ Determinar la concentración del análogo, así como el tiempo de duración adecuado del pulso de luz UV en población para la fotólisis de P1, P2 y P2'.
- ☉ Medir la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ (en el orden de mili-segundos) con el análogo de progesterona fotoactivable elegido.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios y reactivos

Medio para el mantenimiento de espermatozoides de humano. La composición del medio se muestra en la **Tabla 1**. La solución se ajustó a pH 7.4 con NaOH. Se utilizó MEH suplementado con 300 μM de Ca^{2+} para la separación de los espermatozoides por la técnica de *swim-up* y el mantenimiento de la muestra. El MEH suplementado con 2 mM de Ca^{2+} se utilizó para los registros en el fluorímetro.

Compuestos	[final] mM
NaCl	120
KCl	4
NaHCO ₃	15
MgCl ₂	1
HEPES	10
D-glucosa	5
Piruvato de sodio	1
L-Lactato de sodio	10
CaCl ₂	0.3 ó 2

Progesterona. Grado laboratorio (Sigma St. Louis, Mo, USA). Se utilizó en un rango de concentración de 0.3 nM hasta 10 μM .

Fluo3-AM: (N-[2-[[[2-[bis(carboximetil)amino]-5-(2,7-dicloro-6-hidoxi-3-oxo-3H-xanten-9yl)-fenoxy]metil]oxi]-4-metil]-N-(carboximetil)acetoximetilester) (Molecular Probes) (**Figura 10**). Se utilizó una concentración final de 2 μM .

El colorante Fluo3 (**Figura 10**) es un indicador fluorescente para Ca^{2+} (λ_{ex} . 505 nm; λ_{em} . 525 nm). La unión de este ión con el colorante hace que la intensidad de la fluorescencia incremente. $K_d = 390$ nM (MolecularProbes, 2005).

La modificación con el grupo acetoximetil ester (AM) da como resultado una molécula no cargada que permite que el colorante permee por la membrana de las células por difusión pasiva. Una vez adentro de la célula, los grupos lipofílicos son degradados por esterasas no específicas, que permiten que esta sonda fluorescente permanezca en el interior de la célula (MolecularProbes, 2008).

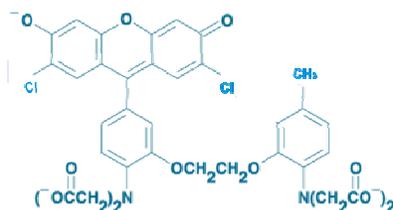


Figura 10. Estructura química del colorante Fluo3.

Compuestos fotoactivables: las progesteronas fotoactivables se obtuvieron gracias a una colaboración con el grupo japonés del Dr. Yoshiro Tatsu en el AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology). Todos los compuestos se modificaron químicamente con el grupo nitrobenzil en los carbonos que poseen una cetona como grupo funcional (carbono 20 y 3) en la progesterona. Los compuestos se nombraron: P1, P2 y P2' (**Figura 11**). P1 corresponde al compuesto con dos modificaciones con el grupo fotosensible, una en el carbono 20 (C20) y la otra en el carbono 3 (C3). P2 está modificada en el C3 con un grupo fotosensible. Por último, P2' posee la modificación en el C20. Todos los compuestos se disolvieron en DMSO, además, la preparación de las alícuotas se realizó en un cuarto semi-oscuro para evitar la fotólisis prematura de los compuestos.

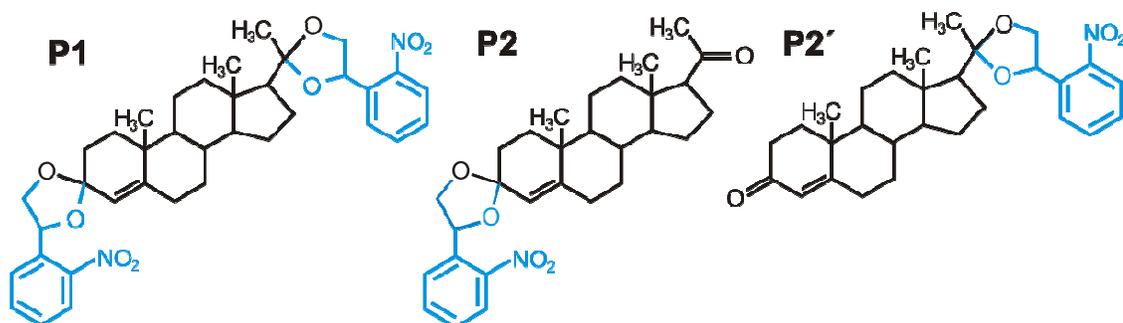


Figura 11. Estructura química de los análogos fotoactivable de progesterona (P1, P2 y P2'). P1 posee dos grupos fotosensibles (nitrobenzil en azul), uno en la posición del C3 y otro en el C20; en cambio P2 y P2' poseen solo una modificación, en la posición 3 (C3) o en la 20 (C20) respectivamente.

2 Material biológico

2.1 Obtención de la muestra

En todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron muestras de espermatozoides de donadores humanos con dos días de abstinencia sexual como tiempo mínimo y siete días como máximo. Se verificó que las muestras (obtenidas por masturbación) cumplieran con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). Tales muestras fueron colectadas en un frasco de plástico estéril y se colocaron inmediatamente en una cámara húmeda a 37°C y con 5% CO₂ durante 30 min. Con el tratamiento anterior se logró deshacer los coágulos que posee el fluido seminal y así facilitar el procesamiento de la muestra, a este proceso se le conoce como licuefacción. En seguida se procedió con el protocolo de separación de los espermatozoides móviles de los no móviles por el método de *swim-up*, que se describe en la siguiente sección.

2.2 Obtención de espermatozoides móviles por la técnica de *swim-up*

Éste es un método en el que se aprovecha la movilidad de los espermatozoides para su separación sin necesidad de utilizar químicos que estresen o afecten la viabilidad de las células o la estructura de la membrana plasmática. Este método está basado en la migración de los espermatozoides del fluido seminal a una fase superior con medio artificial en un tubo de ensayo (Makler *et al.*, 1984). La técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Después de la licuefacción, se colocó 1 ml de semen en un tubo de ensayo y muy lentamente se agregó 1 ml de MEH (suplementado con 300 µM de Ca²⁺). En este paso es muy importante que no se mezclen las fases.
2. Se colocó el tubo con una inclinación de 45° dentro de una gradilla y se incubó durante 1 hora dentro de una cámara húmeda a 37°C y con 5% de CO₂.
3. Después de la incubación, se recuperaron 700 µl de la fase superior del tubo y se llevó este volumen a 1 ml con MEH (suplementado con 300 µM de Ca²⁺). Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 3,000 rpm.
4. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de MEH (suplementado con 300 µM de Ca²⁺).

El ajuste de la concentración celular se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron 10 μl de la solución con espermatozoides y se colocaron en una cámara de Makler (Makler, 1978)). La cual es una herramienta diseñada específicamente para calcular el número de espermatozoides contenidos en 1 ml de muestra. Esta cámara cuenta con un cubreobjetos cuadrulado (10 x 10), de manera que el número de células contenido en 10 cuadros se multiplica por un factor de un millón, lo que permite calcular la cantidad final de células en 1ml.

3. Incorporación del colorante Fluo3-AM en espermatozoides de humano

Después de la obtención de las células móviles, se adicionó el colorante Fluo3-AM (concentración final 2 μM). Posteriormente se incubó la solución durante $\frac{1}{2}$ hr en una cámara húmeda a 37°C y con 5% de CO_2 . Al terminar el tiempo de incubación las células se centrifugaron durante 5 min a 3,000 rpm para remover de la solución el colorante libre que no entró a las células. La pastilla obtenida se resuspendió en el mismo volumen (MEH suplementado con 300 μM de Ca^{2+}). Esta solución se mantuvo a 37°C hasta el término de los experimentos.

4. Fluorimetría con espermatozoides cargados con Fluo3

Para determinar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por progesterona y sus análogos en espermatozoides cargados con Fluo3, medimos la intensidad de fluorescencia en población. Para este objetivo se utilizó un fluorímetro marca Aminco modelo SLM-8000 (**Figura 12**). La fuente de iluminación es una lámpara de xenón. Se utilizó una λ_{ex} : 505 nm y de λ_{em} : 525 nm (correspondiente al Fluo3). Este sistema también posee un agitador magnético para homogenizar de manera rápida la muestra y los compuestos añadidos. Una conexión a un baño de circulación permite mantener la temperatura a 37°C. Los registros de fluorescencia se hicieron en tubos de vidrio con capacidad de 2 ml y se añadieron 600 μl de MEH suplementado con 2 mM de Ca^{2+} ; en cada registro se agregaron 2×10^6 células (previamente cargadas con Fluo3) y se dejó incubar 2 min para homogenizar y estabilizar la muestra. El registro de fluorescencia se hizo durante

100 seg a una frecuencia de 2 Hz. El compuesto a probar (progesterona, P1, P2 o P2') fue añadido al segundo 30. Para la muestra control se utilizaron únicamente 2 µl del vehículo (DMSO) para descartar algún efecto de este compuesto. Se agregaron 2 µl de DMSO porque es la cantidad de vehículo máxima que se empleó al agregar los distintos compuestos.

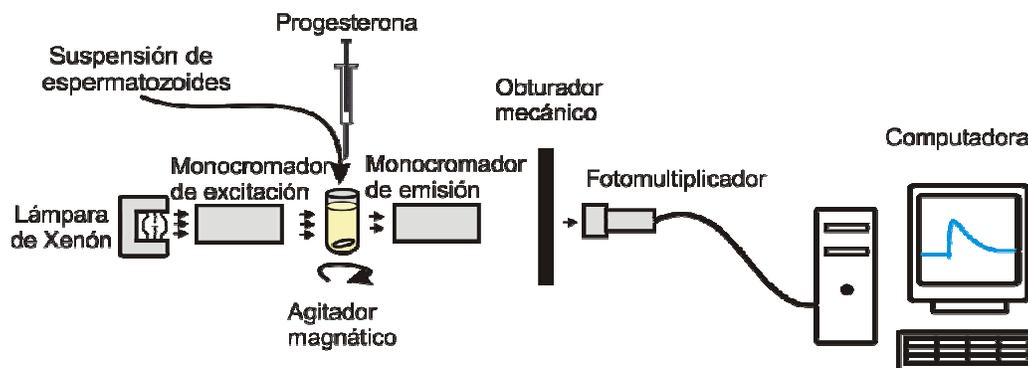


Figura 12. Esquema del fluorímetro SLM-8000. La fuente de luz es una lámpara de xenón. Esta luz pasa por un monocromador de excitación que deja pasar la longitud de onda del Fluo3 (505 nM). Posteriormente, la luz de fluorescencia pasa por el monocromador de emisión (525 nm) y la señal captada se amplifica en el fotomultiplicador que se encuentra conectado a una computadora.

5. Realización de curvas dosis-respuesta

Los datos obtenidos en el fluorímetro SLM-8000 Aminco fueron analizados para generar las curvas dosis-respuesta de los compuestos de la **Tabla 2**. Durante cada prueba realizada se usó todo el gradiente de concentración por duplicado, comenzando de mayor a menor concentración y posteriormente de menor a mayor concentración. La adición del compuesto se hizo después de que la $[Ca^{2+}]_i$ se mantuviera estable por 30 seg. Para determinar el efecto dosis-respuesta, se midió el incremento en la intensidad de fluorescencia después del estímulo (el máximo alcanzado) y se comparó con la intensidad basal en las distintas concentraciones.

Tabla 2. Compuestos probados, "n" y rango de concentración.		
Compuesto	n	Rango de concentración
Progesterona	6	0.3 nM-10 µM
P1	4	1 nM-10 µM

P2	4	1 nM-10 μ M
P2'	7	1 nM-10 μ M

6. Tratamiento de datos

Los datos se obtuvieron con el programa *Olis GlobalWorks* y se exportaron a *Excel 2003* para su análisis. Los resultados se estandarizaron utilizando la fórmula: F/F_0 ; donde F es la fluorescencia en un momento dado y F_0 es el valor de fluorescencia basal, es decir, la fluorescencia antes de añadir los compuestos. F_0 se obtuvo tomando el promedio del valor de fluorescencia desde el tiempo "0" hasta antes de la adición del compuesto.

Para determinar el aumento de intensidad (amplitud de respuesta, **Figura 13**), que corresponde a la amplitud del incremento transitorio, se determinó el cociente entre el punto máximo del transiente y el valor de F_0 .

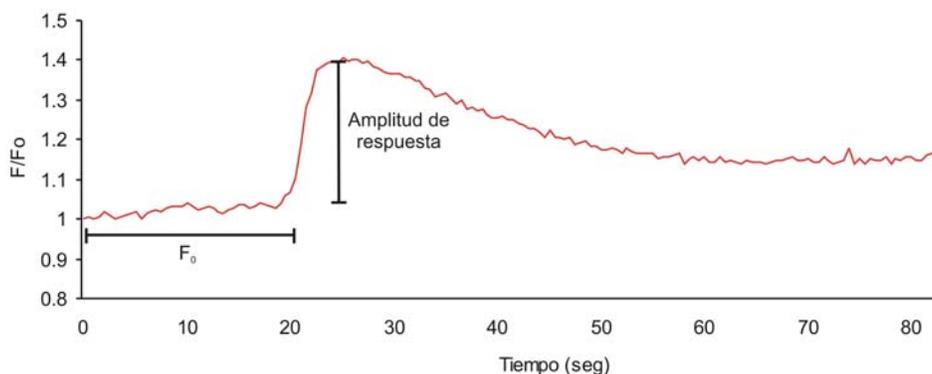


Figura 13. Trazo representativo de progesterona (3 μ M). En el trazo se muestra lo que se tomó como fluorescencia basal (F_0), así como la amplitud de la respuesta.

Para la normalización de las curvas dosis-respuesta, tanto de los compuestos fotoactivables (P1, P2 y P2') como de la progesterona, se tomó el valor máximo de progesterona (3 μ M) como 100%. A partir de este valor se calculó el porcentaje alcanzado por las distintas concentraciones de todos los compuestos probados (**Figura 14**).

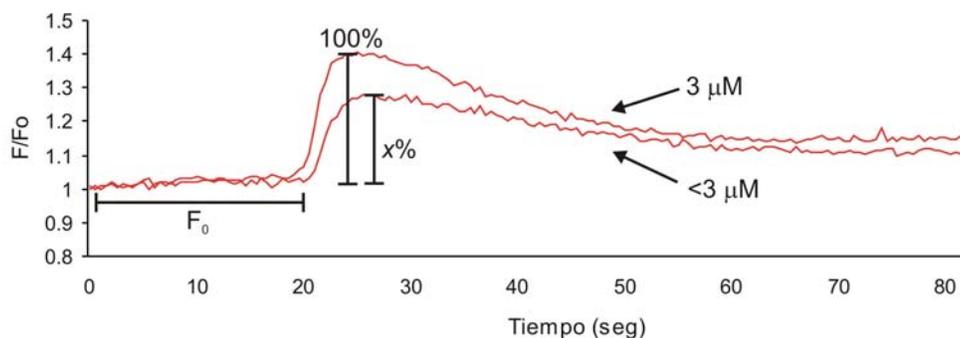


Figura 14. Esquema de dos trazos de progesterona. Se muestra un trazo de 3 μM de progesterona y otro de una concentración menor. A la amplitud de respuesta de 3 μM de progesterona, se le asignó el valor de 100%, a partir de éste se calcularon los porcentajes equivalentes de las distintas concentraciones de todos los compuestos probados.

Únicamente los datos de la curva dosis-respuesta de progesterona se lograron ajustar a una ecuación, la de *Hill* con el programa *SigmaPlot 8.0*, con el cual se obtuvo la ecuación de la curva y se determinó la concentración donde se alcanza el 50% de respuesta (EC_{50}).

Para explorar la disminución de la actividad basal de los análogos enjaulados, se comparó la concentración en la cual los análogos alcanzan el 50% de respuesta respecto al EC_{50} de la progesterona. Ya que no fue posible ajustar las curvas dosis-respuesta a ninguna ecuación, el 50% de la respuesta respecto a 3 μM a progesterona se obtuvo extrapolando el valor del porcentaje (eje y) con su respectiva concentración (eje x) para cada uno de los análogos. Posteriormente se calculó la desviación estándar para los tres análogos.

7. Ensayos de fotólisis

El siguiente paso en la evaluación fue determinar la duración óptima del pulso de luz UV, así como las concentraciones con las cuales se obtiene la mejor respuesta con los análogos después de la fotólisis. Se probaron pulsos de distinta duración, así como cuatro diferentes concentraciones de los 3 análogos (**Tabla 3**). En este paso se utilizó el mismo fluorímetro acoplado con una lámpara y un disparador de luz UV para fotoactivar la progesterona (**Figura 15**).

<p>Tabla 3. Concentraciones y duración de pulsos de luz UV utilizados para la evaluación de las progesteronas fotoactivables.</p>
--

Compuesto fotoactivable	Rango de duración de luz UV	Concentraciones
P1	50-500 msec	100 nM – 31.6 μ M
P2	50-500 msec	10 nM – 3.16 μ M
P2'	50-500 msec	10 nM – 3.16 μ M

En este paso se utilizaron tubos de vidrio con capacidad de 600 μ l y se añadieron 200 μ l de MEH suplementado con 2 mM de Ca^{2+} ; para poder observar el cambio de intensidad en los registros se agregaron 4×10^6 células. Cada muestra se incubó durante 5 min con el análogo P2' y posteriormente se inició el registro, el cual duró 50 seg y se hizo a una frecuencia de 5 Hz. Se dieron 3 pulsos de luz UV de la misma duración, a los 10, 25 y 40 seg. Se estandarizó como F/F_0 y se comparó el aumento en la intensidad de fluorescencia, así como la mitad del tiempo en llegar al máximo ($t/2$) de los 3 análogos fotoactivables.

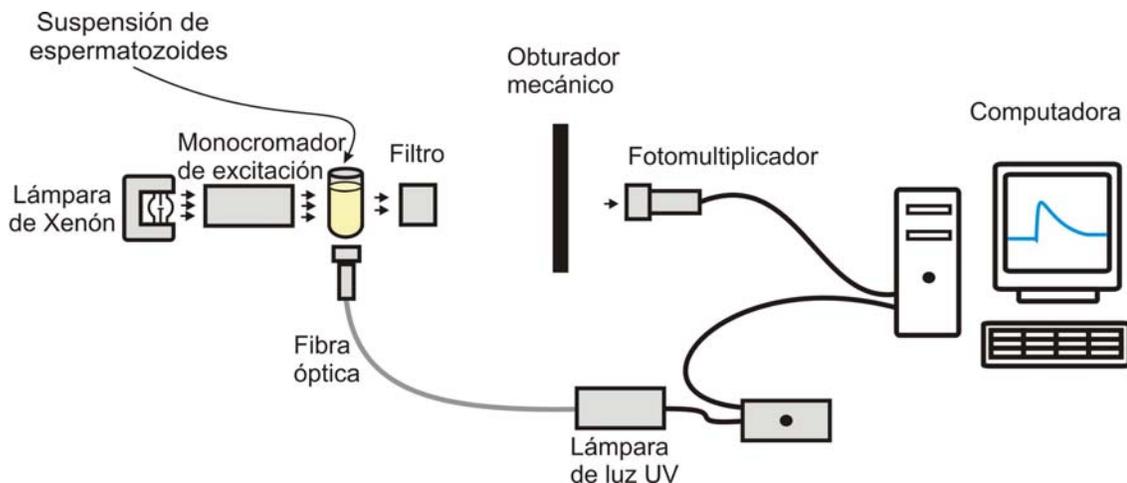


Figura 15. Esquema del fluorímetro SLM-8000 acoplado a una fuente de luz UV. La fuente de luz es una lámpara de xenón que pasa por el monocromador de excitación y posteriormente por el de emisión. El obturador mecánico está conectado a un generador de pulso y éste a su vez a una computadora y a un disparador. El obturador mecánico se cierra antes de que pase el haz de luz UV y se abre después del término del pulso, de tal manera que el haz no sature la señal. El registro de fluorescencia es amplificado por un fotomultiplicador conectado a una computadora.

8. Estimación de la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis

Con los datos del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la fotólisis y la ecuación de la curva dosis-respuesta de progesterona, se estimó la concentración de

progesterona que se libera después de la fotólisis con los distintos análogos enjaulados en las diferentes concentraciones probadas.

La ecuación obtenida de la curva dosis-respuesta de progesterona:

$$Y = \frac{x a}{x + b}$$

Donde:

Y = $\Delta F(\%)$, que corresponde a la diferencia de fluorescencia en porcentaje

x = concentración estimada de progesterona

a = valor máximo de señal (100% del efecto)

b = concentración de progesterona con la cual se alcanza el 50% de la respuesta, $EC_{50} = 50 \text{ nM} \pm 18$

Es importante aclarar que el valor de **b** = $50 \text{ nM} \pm 18$ es diferente al del ajuste (46.3 nM) porque **b** se determinó con el promedio del EC_{50} , obtenido del ajuste de *Hill* de las curvas de los diferentes días (n=6), con su respectiva DS.

Posteriormente al despejar “x” (concentración estimada de progesterona) de la ecuación anterior, obtenemos:

$$x = \frac{Y b}{a - b}$$

El siguiente paso fue calcular el porcentaje de progesterona que se libera de la fotólisis con una regla de tres simple. Consideramos “X” como la concentración estimada de progesterona fotoactivada y “% de liberación” como el porcentaje de progesterona fotoactivada.

$$\% \text{ liberación} = \frac{x (100)}{[\text{Análogo}]}$$

9. Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ con alta resolución temporal

Después de la evaluación de los análogos se escogió P2' (la explicación se encuentra mas adelante). Se probaron tres distintas concentraciones (100 nM, 316

nM y 1 μ M) y cuatro duraciones de pulsos (50 mseg, 100 mseg, 200 mseg y 500 mseg) para las mejores condiciones donde se pueda observar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ con alta resolución temporal. Solo se muestran los resultados con las condiciones donde se observó el incremento mas claro en la $[Ca^{2+}]_i$. Los ensayos de alta resolución temporal se realizaron en el mismo fluorímetro, acoplado a un disparador y a una lámpara de luz UV (**Figura 15**). Para esta parte, la frecuencia de adquisición fue de 200 Hz durante 5 seg. En estas pruebas se determinó el tiempo donde comienza el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. El control negativo consistió en aplicar el pulso de luz UV a una muestra con espermatozoides cargados con Fluo3 sin adicionar ningún análogo enjaulado, en estos casos no hubo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

La condición elegida para cinética rápida fue el análogo P2' en concentración 1 μ M estimulado con 200ms de luz UV. Los datos obtenidos con el programa *Olis* fueron exportados a *Excel* para hacer las pruebas estadísticas. Los datos del registro control (espermatozoides cargados con Fluo3 sin P2') se compararon con el promedio de 3 experimentos (espermatozoides cargados con Fluo3 e incubados con P2') y se determinó el momento a partir del cual los valores son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

VII. RESULTADOS

1. Determinación de las curvas dosis-respuesta de: progesterona, P1, P2 y P2´

La primer parte de la evaluación de los compuestos fotoactivables consistió en elaborar curvas dosis-respuesta de los análogos, es decir medir la actividad (aumento en la $[Ca^{2+}]_i$) sin fotoactivar. También se midió la actividad inducida por progesterona en espermatozoides de humano para poder compararla con la de los compuestos fotoactivables. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se midió en población, cargando a los espermatozoides con el colorante fluorescente para Ca^{2+} Fluo3.

La curva dosis-respuesta de progesterona (**Figura 16**) se elaboró utilizando un rango de concentración de 0.3 nM a 10 μ M. La EC_{50} se obtuvo con 50 nM (\pm 18) de progesterona (en métodos se explica la obtención de este valor), que es similar al valor reportado previamente (Harper et al., 2003). La mayor respuesta se obtiene con 3 μ M, al igual que en estudios previos (Harper *et al.*, 2003).

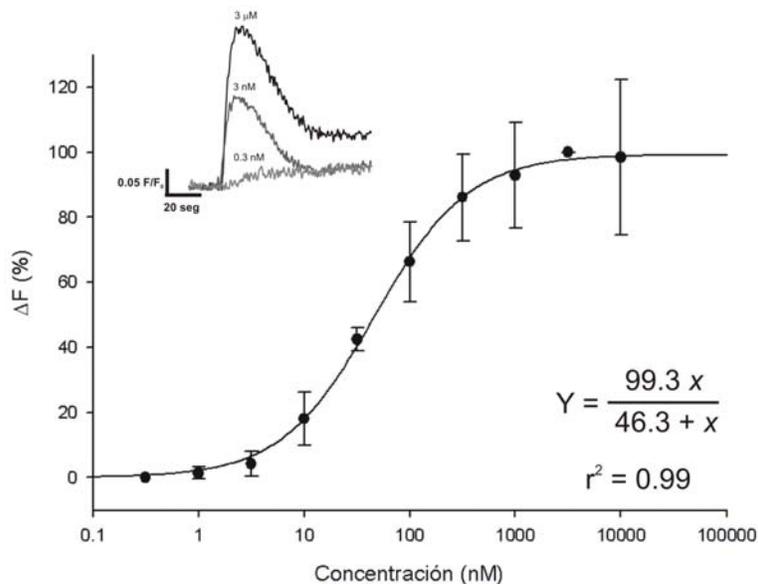


Figura 16. Curva dosis-respuesta de progesterona en espermatozoides de humano. La respuesta máxima se obtiene con 3 μ M de progesterona. Cada curva se normalizó respecto a este punto. El EC_{50} es de 46.3 nM, este valor fue obtenido del ajuste con la ecuación de Hill. Las líneas representan la desviación estándar (DS) de la curva, n=6.

Posteriormente se realizaron las curvas de los compuestos fotoactivables (P1, P2 y P2´). La actividad basal de P1 -el análogo enjaulado con modificaciones en el carbono 3 (C3) y en el 20 (C20)- es la mas baja de los tres análogos, esta análogo no alcanzó ni la mitad de la respuesta respecto a la curva de progesterona

(Figura 17). La actividad de P1 se redujo más de 1000 veces respecto a la progesterona, indicando que su actividad basal es muy baja, es decir, las modificaciones con los grupos fotosensibles abaten casi por completo la actividad de la molécula. Ésta última propiedad es una buena característica de los compuestos fotoactivables, pero como se verá posteriormente se deben tomar en cuenta más parámetros en la evaluación.

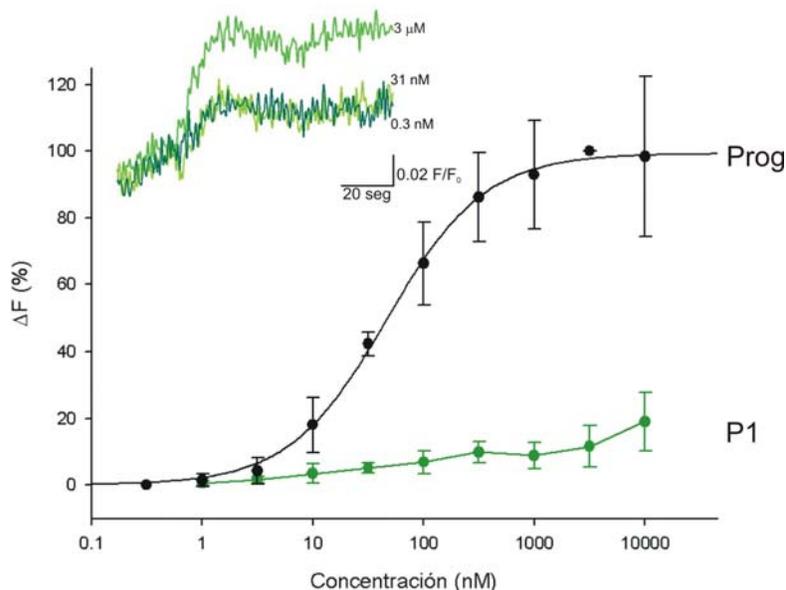


Figura 17. Curva dosis-respuesta de P1 (en verde) y progesterona (en negro) en espermatozoide de humano. P1 es el análogo que presentó la actividad basal mas baja de los tres compuestos fotoactivables probados, sin alcanzar el 50% de la respuesta respecto a progesterona. Las barras de error representan la DS de la curva. $n = 4$. En la esquina superior izquierda se muestran trazos representativos de la actividad basal de P1 en distintas concentraciones.

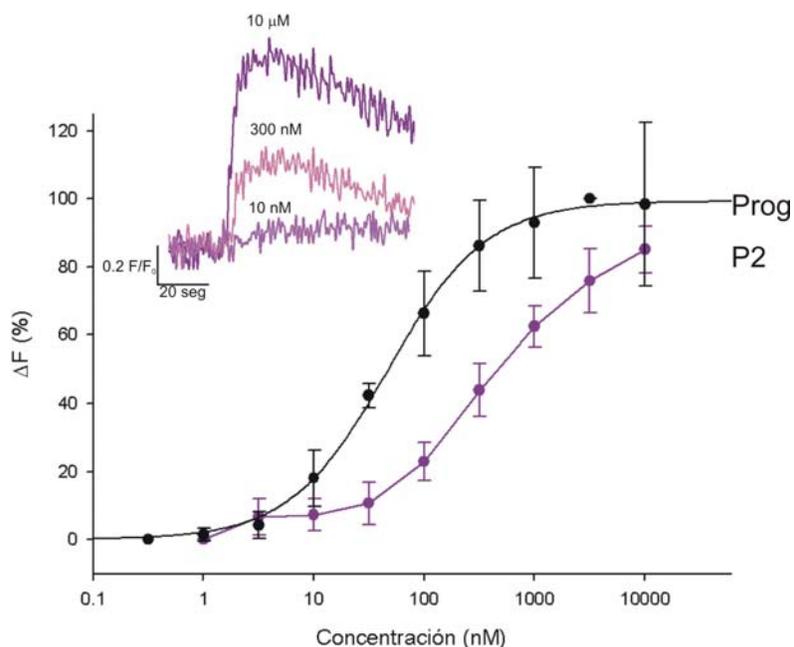


Figura 18. Curva dosis-respuesta de P2 (en morado) y progesterona (Prog, en negro) en espermatozoide de humano. P2 disminuyó ~13 veces su actividad basal, respecto a la progesterona. P2 alcanzó el 50% de la respuesta de progesterona con 640 nM. Las barras de error representan la DS. n = 4. En la esquina superior izquierda se muestran trazos representativos de la actividad basal de P2 en distintas concentraciones.

Respecto a P2, el análogo con una modificación en el C3, la actividad basal disminuyó ~13 veces (**Figura 18**), la cual es mayor que la de P1. Este compuesto alcanzó el 50% de la respuesta respecto a progesterona a una concentración de $640 \text{ nM} \pm 292$ (DS).

En cambio, P2' (análogo con modificación en el C20) disminuyó ~8 veces su actividad basal y se obtuvo el 50% de respuesta respecto a progesterona con $420 \text{ nM} \pm 350$ (DS) (**Figura 19**). Por lo tanto, una modificación no es suficiente para no tener actividad basal. Tanto P2 como P2' poseen actividades basales altas, lo cual no es ideal cuando se usan compuestos fotoactivables, pero al igual que en el caso de P1, se necesitan tomar en cuenta más parámetros para poder elegir compuestos fotosensibles que sean de utilidad. La elección de los enjaulados también depende de las necesidades de los experimentos y de las preguntas que se quiere responder, por lo que uno puede ser flexible respecto a las características de actividad basal y/o fotólisis.

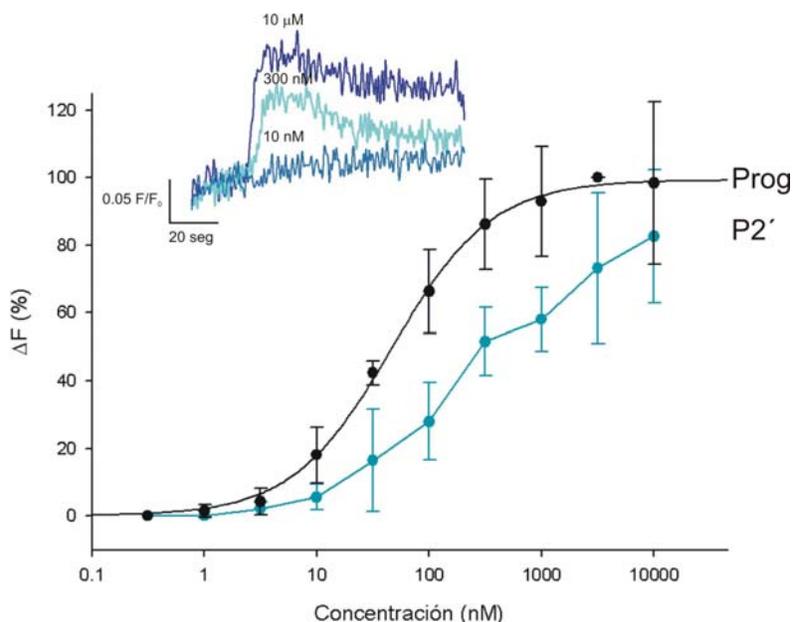


Figura 19. Curva dosis-respuesta de P2' (en azul) y progesterona (Prog, en negro) en espermatozoide de humano. P2' disminuyó ~8 veces su actividad basal respecto a la progesterona. El 50% de respuesta respecto al control se alcanzó con 420 nM. Las barras de error representan la DS. n = 6. En la esquina superior izquierda se muestran trazos representativos de la actividad basal de P2' en distintas concentraciones.

2. Determinación de la duración del pulso de luz UV y la concentración del análogo fotoactivable

En la siguiente parte de la evaluación, se probaron distintas duraciones de pulsos de luz UV, desde 50 hasta 500 mseg, así como distintas concentraciones de los análogos fotoactivables para los distintos pulsos (**Tabla 3**).

Al inicio se probaron diferentes concentraciones de los compuestos enjaulados con la misma duración de pulso: 500 mseg. En estas primeras pruebas se observaron diferencias en la amplitud de la respuesta en las diversas concentraciones de los tres análogos (P1, P2, P2').

En el caso de P1 se utilizaron las siguientes concentraciones: 100 nM, 316 nM, 1 μM , 3.16 μM , 10 μM y 31.6 μM (**Figura 20**). Debido a que no había aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se utilizaron concentraciones mayores a las que se utilizaron con P2 y P2'. Para la fotoactivación de progesterona se dieron 3 pulsos de 500 mseg en el mismo trazo, esto con el fin de observar si sólo existía un aumento en el Ca^{2+} intracelular o si éste se repetía con cada pulso. En el último caso, podría deberse a que no se ha llegado a la saturación y sigue habiendo liberación de progesterona.

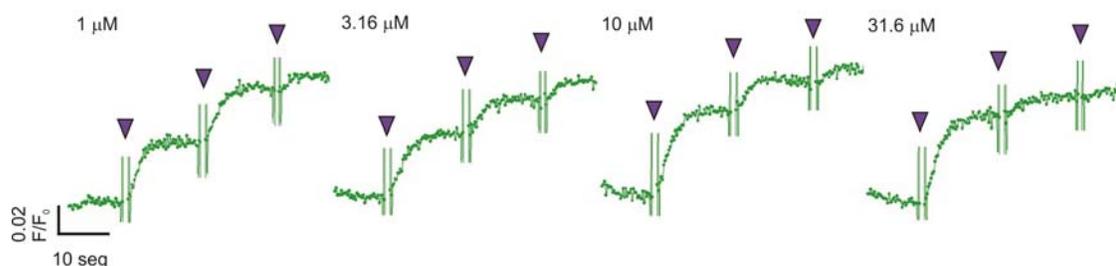


Figura 20. Fotólisis de P1 con estimulación de 500 mseg de luz UV (\blacktriangledown). Trazos representativos de la fotólisis de P1 en distintas concentraciones (1 μM – 31.6 μM). La concentración que alcanzó la mayor amplitud en la respuesta fue 10 μM . En todos los casos, con los pulsos subsiguientes, hay aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y estos son mayores al incremento del primer transiente.

La amplitud de P1 fue la más pequeña de los tres análogos. Con P1, el máximo se obtuvo con 10 μM , que corresponde al 20% de la respuesta respecto a la progesterona (3 μM) (ver **Figura 23** más adelante). Algo notorio, es que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ continúa aumentando en los pulsos subsiguientes (**Figura 20**), probablemente porque los receptores que quedan libres después del primer

estímulo van siendo ocupados en los siguientes pulsos de UV y producen la respuesta fisiológica que se está midiendo. Esto puede deberse a una baja eficiencia de fotólisis, es decir, se libera poca progesterona en el medio. Ya que si el pulso de luz UV no es lo suficientemente largo, la fotólisis puede ocurrir en sólo una de las dos modificaciones, liberando así P2 (y un producto secundario que se discutirá posteriormente) y P2'.

En el caso de P2 se utilizaron concentraciones en un rango menor a P1: 10 nM, 31.6 nM, 100 nM, 316 nM, 1 μ M y 3.16 μ M (**Figura 21**). Las concentraciones fueron menores debido a que la sensibilidad al compuesto es mayor y a que con mayores concentraciones puede haber actividad antes de la estimulación con luz UV. Las amplitudes de P2 obtenidas fueron, en su mayoría, mayores que las de P1. Sin embargo, el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ después del segundo pulso fue menor, comparando con P1. Con P2 la concentración que indujo la mayor amplitud en el $[Ca^{2+}]_i$ fue 316 nM, alcanzando aproximadamente 16% de la respuesta de la progesterona sin modificaciones (3 μ M) (ver **Figura 24** más adelante).

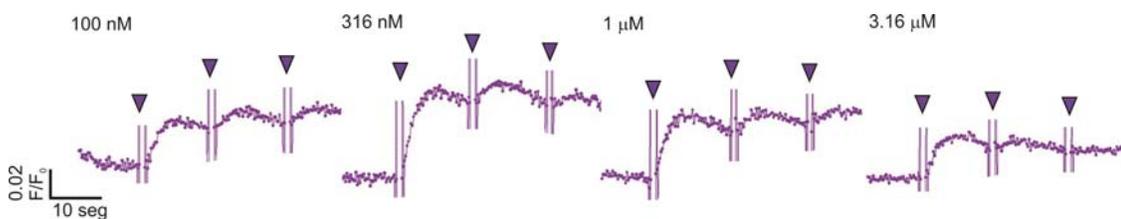


Figura 21. Fotólisis de P2 con 500 mseg de luz UV (\blacktriangledown). Se muestran trazos representativos de la fotólisis de P2 en distintas concentraciones (100 nM – 3.16 μ M). La concentración que alcanzó la mayor amplitud en la respuesta fue 316 nM. En los pulsos consecutivos no hay aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ como el de P1 (ver **Figura 20**).

Para P2' se utilizaron concentraciones en el mismo rango que para P2 (**Figura 22**). Este análogo obtuvo la mayor amplitud en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los pulsos consecutivos es menor comparado con P1 y P2. La concentración que indujo la mayor amplitud en la respuesta fue 100 nM, que equivale aproximadamente 30% de amplitud respecto a la progesterona (ver **Figura 25** más adelante). Al comparar las cinéticas de P2 y P2' se observó que la velocidad de respuesta de P2 es más lenta. Esto resulta interesante ya que a pesar de que no hay gran diferencia entre las curvas dosis-respuesta y de que ambos compuestos sólo tienen una modificación, si se existe diferencia en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la fotólisis con 500 mseg de luz UV.

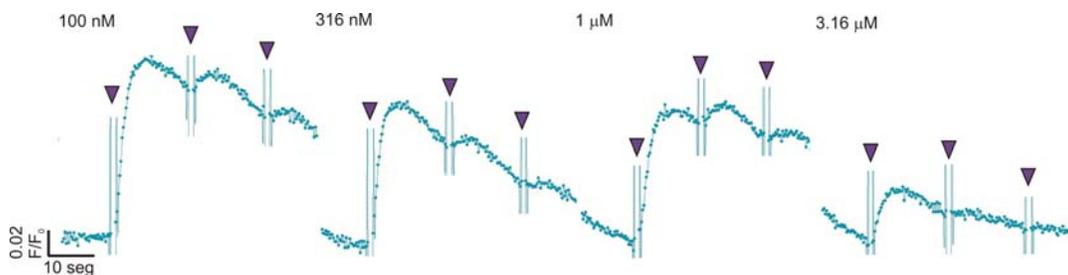


Figura 22. Fotólisis de P2' con 500 msec de luz UV (▼). Trazos representativos de la fotólisis de P2' (100 nM – 3.16 μM). La concentración que alcanzó la mayor amplitud en la $[Ca^{2+}]_i$ de los tres análogos fue 100 nM. Este análogo es el que tuvo la respuesta más similar a la progesterona sin modificaciones. En los pulsos consecutivos no hay un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ comparable como en el caso de P1.

Con base en lo anterior, con la colaboración del Dr. Tatsu se analizó el resultado de los productos liberados después de la fotólisis de P2, y se encontró un producto secundario diferente a la progesterona. Este último probablemente no induce aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de la misma manera que la progesterona, además la concentración de progesterona liberada es menor que lo esperado. Debido a esto no se observa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ como el inducido por la fotólisis de P2' o con progesterona. Esto se discutirá posteriormente.

Debido a la aparente diferencia en la cinética de P2 y P2' después de la fotoactivación (**Figuras 21 y 22**) se cuantificó la amplitud de la respuesta de los tres análogos respecto al aumento en progesterona (**Figuras 23 a 25**) y el t/2 (tiempo en llegar al pico máximo dividido entre 2).

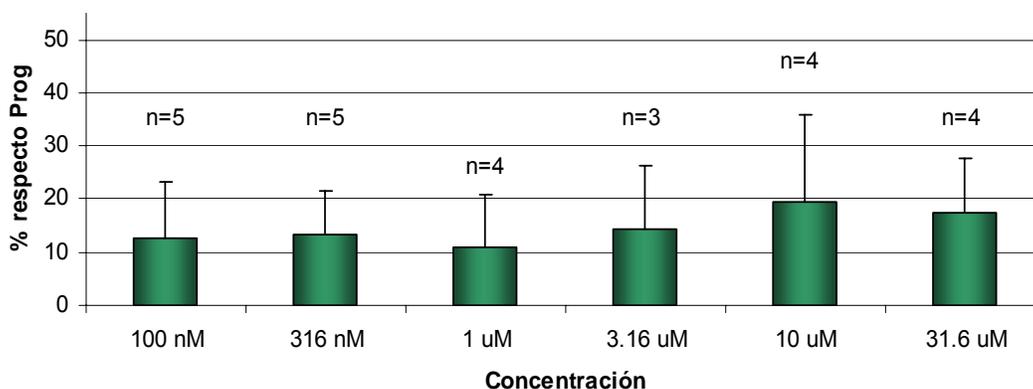


Figura 23. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la fotoactivación de P1. Se muestra el porcentaje de las amplitudes alcanzadas por diferentes concentraciones de P1 respecto a la progesterona, 3 μM (Prog). En el eje de las x se muestran las concentraciones probadas de P1. Cabe notar que con 10 μM se obtuvo 20% del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ respecto al control. n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones. Al hacer el análisis estadístico con una comparación paramétrica múltiple, con el programa *KyPlot 2.0*, resultó que no hay diferencia significativa entre todas las concentraciones.

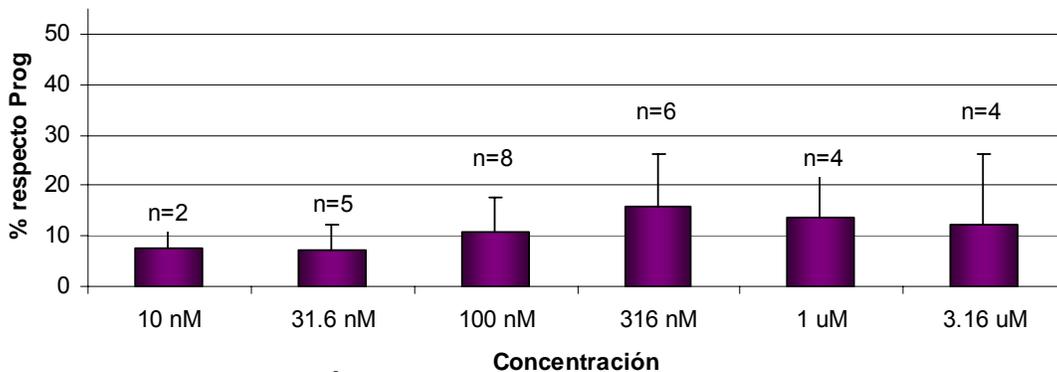


Figura 24. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por P2. Se muestra el porcentaje de las amplitudes de diferentes concentraciones de P2 (eje de las x), respecto a progesterona, 3 μ M (Prog). El mayor incremento se obtuvo con 316 nM (~20%). n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones. Al hacer el análisis estadístico con una comparación paramétrica múltiple, con el programa *KyPlot 2.0*, resultó que no hay diferencia significativa.

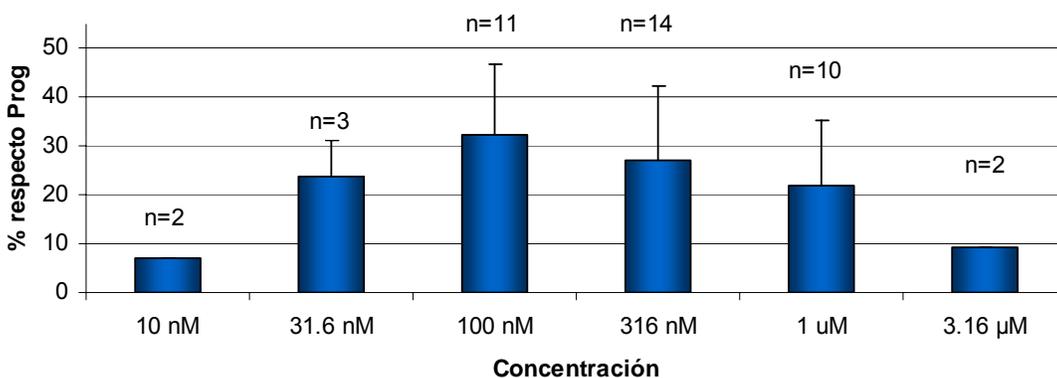


Figura 25. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por P2'. Se muestra el porcentaje de las amplitudes de distintas concentraciones de P2' (en el eje de las x) respecto a la progesterona, 3 μ M (Prog). El mayor incremento, de 34%, se obtuvo con 100 nM y el más bajo con 10 nM. n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones. Al hacer el análisis estadístico con una comparación paramétrica múltiple, con el programa *KyPlot 2.0*, resultó que no hay diferencia significativa.

En los tres histogramas de la amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ respecto a progesterona, se observa que en las concentraciones inferiores el porcentaje de amplitud obtenida es bajo; pero posteriormente hay un rango donde el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ -después de la fotólisis- es mayor. Una vez superadas estas concentraciones la respuesta vuelve a disminuir (**Figuras 23 a 25**).

Al medir el $t/2$ de P2, observamos que casi todas las concentraciones tardan más tiempo en llegar al pico máximo si las comparamos con P2', excepto 316 nM de P2, que responde más rápido que la misma concentración de P2' y esta diferencia es estadísticamente significativa ($*P < 0.05$). La amplitud de 316 nM

de P2 equivale al 20% del control (progesterona 3 μ M) y alcanza el pico en 2.8 seg. En cambio, P2' alcanza 30% en 3.3 seg.

Es importante mencionar que debido a la alta actividad basal de P2 y P2', se puede inferir que estos compuestos están ocupando los receptores antes de la fotoactivación, por lo que hay cierta señal de fondo que se encuentra incrementada antes del estímulo.

Respecto a 1 μ M, si se compara el t/2 de P2 y P2' no hay diferencia significativa. Pero la amplitud alcanzada es diferente, P2 alcanza casi 20% y P2' 22% de la respuesta respecto a progesterona (**Figura 26**). En este caso se comprueban las diferencias entre ambos análogos, siendo P2 menos eficiente.

Al comparar el t/2 de 100 nM correspondientes a P2 y P2' existe una diferencia significativa, siendo más rápido P2' y alcanzando 33% de respuesta; a diferencia de P2 con sólo 16%. Debido a lo anterior consideramos que P2' es más eficiente (**Figura 26**).

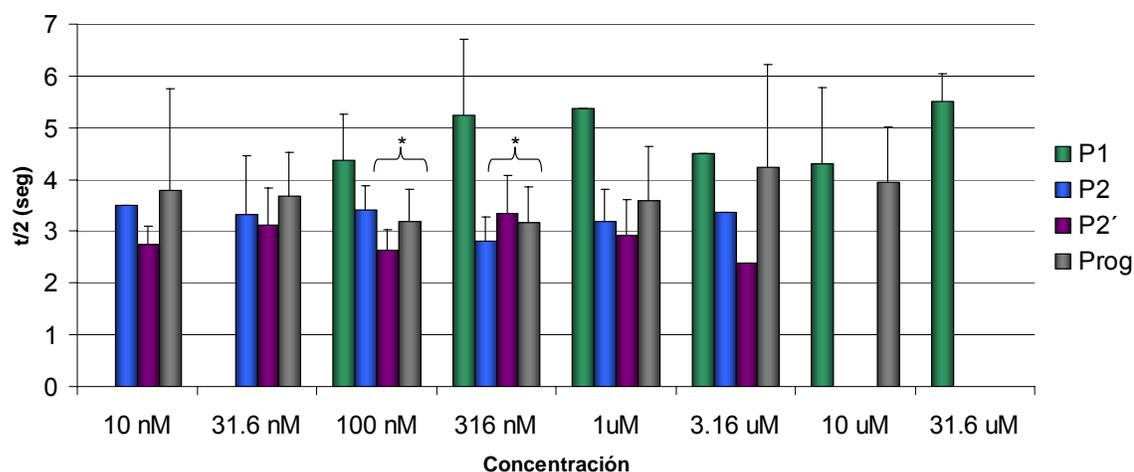


Figura 26. t/2 en llegar al pico de distintas concentraciones de los análogos fotoactivables y de la progesterona. En la gráfica se muestra el t/2 del tiempo (en segundos) que tarda en alcanzar el pico máximo un análogo en distintas concentraciones, así como la progesterona (con estímulo convencional). Las diferencias son significativas ($*P < 0.05$) en el t/2 de 100 nM, 316 nM y 1 μ M de P2 y P2'. Con la concentración de 100 nM de P2', el t/2 es más rápido de manera significativa ($*P < 0.05$) que P2 a la misma concentración. La concentración 316 nM de P2 es más rápido el aumento que en P2' a la misma concentración ($*P < 0.05$). En 1 μ M de P2 y P2' no hay diferencia significativa. Respecto a P1 en todos los casos tardo más que los otros compuestos en alcanzar el pico máximo. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones.

Al hacer el análisis estadístico y comparar la amplitud de 100nM (33.4%) y 316 nM (27.1%) de P2', no existe diferencia significativa. Aún cuando no hay diferencia en la amplitud, si consideramos el t/2, si existe un cambio estadísticamente significativo ($P<0.05$) (Figura 26). Por lo que es mejor la concentración con la cinética más rápida, (más similar a la progesterona).

En la **Tabla 4** se resumen los valores de las amplitudes y el t/2 de los tres análogos fotoactivables en distintas concentraciones.

Tomando los datos de la amplitud y del t/2 decidimos que el mejor análogo para estudios de población es P2' en un rango de 100 nM a 316 nM. Debido a que con estos análogos se obtiene el mayor porcentaje de respuesta respecto al control (progesterona 3 μ M) y la cinética es la más similar a la progesterona. Además, sabemos que para P2' no hay productos secundarios inespecíficos, como sucede en el caso de P2.

Considerando que la luz UV puede ser dañina para las células, se disminuyó la duración del pulso de luz UV y determinamos si las respuestas aun pueden ser útiles para nuestro estudio. Por ello probamos 250 msec, 100 msec y 50 msec de irradiación con luz UV con tres diferentes concentraciones de P2' (100 nM, 316 nM y 1 μ M).

Tabla 4. Amplitud del transiente y t/2 de los análogos de progesterona fotoactivables.								
Concentración	P1		P2		P2'		Prog	
	Amplitud (%)	t/2 (seg)						
10 nM			8 (\pm 8)	3.5 (nd)	7 (nd)	2.8 (\pm 0.4)	18.1 (\pm 8.3)	3.8 (\pm 1.9)
31.6 nM			7 (\pm 5)	3 (\pm 1)	24 (\pm 7)	3.1 (\pm 0.7)	42.4 (\pm 3.6)	3.7 (\pm 0.6)
100 nM	12 (\pm 10)	4.4(\pm 0.9)	11 (\pm 7)	3.4 (\pm 0.5)	32 (\pm 14)	2.6 (\pm 0.4)	66.4 (\pm 12.3)	3.2 (\pm 0.6)
316 nM	13 (\pm 8)	5 (\pm 1.5)	16 (\pm 10)	2.8 (\pm 0.5)	27 (\pm 15)	3.4 (\pm 0.7)	86.1 (\pm 13.4)	3.2 (\pm 0.7)
1 μM	11 (\pm 10)	5.0 (nd)	14 (\pm 10)	3.2 (\pm 0.6)	22 (\pm 13)	2.9 (\pm 0.7)	92.9 (\pm 16.3)	3.6 (\pm 1.0)

3.16 μM	14 (± 12)	4.0 (nd)	12 (± 14)	3.4 (nd)	9.0 (nd)	2.4 (nd)	100 (± 0.0)	4.2 (± 2.09)
10 μM	19 (± 17)	4.3 (± 1.5)					98.4 (± 24.0)	3.9 (± 1.0)
31.6 μM	17 (± 10)	5.5 (± 0.5)						

Se muestra la amplitud de respuesta (%) y el t/2 (seg) de los análogos enjaulados (P1, P2 y P2') y de progesterona con su DS en distintas concentraciones. (nd) = no determinado.

Utilizando 250 msec y 100 nM de P2' se obtiene una respuesta de 10% respecto al control (progesterona 3 μM), con 316 nM respondió 17% y con 1 μM 16%. Al hacer el análisis estadístico para saber si estas respuestas son diferentes entre si, resultó que no hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las respuestas. Al comparar la amplitud de la respuesta de las mismas concentraciones de P2' (100 nM, 316 nM y 1 μM) con dos distintos pulsos (250 msec vs 500 msec) resultó que no hay diferencia significativa entre 316 nM y 1 μM ($P < 0.05$), pero si hay diferencia en la respuesta de 100 nM con 250 msec (~10%) contra 100nM con 500 msec (~30%) (**Figuras 27 a 29**).

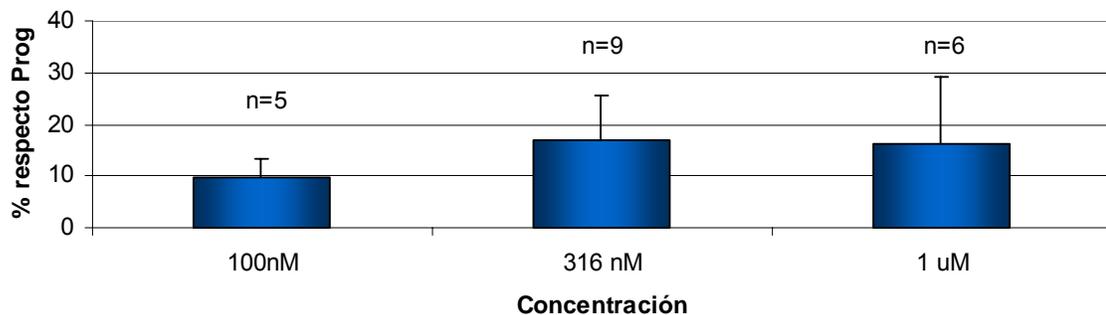


Figura 27. Amplitud de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de P2' estimulando con 250 msec de luz UV. Se muestran las amplitudes alcanzadas por tres concentraciones del análogo P2'. La concentración de 100 nM alcanzó 10% respecto al control (progesterona 3 μM), 316 nM que aumentó 17% y 1 μM presentó 16% de la respuesta. La diferencia entre el aumento de estas tres concentraciones no es significativa ($*P < 0.05$). n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones.

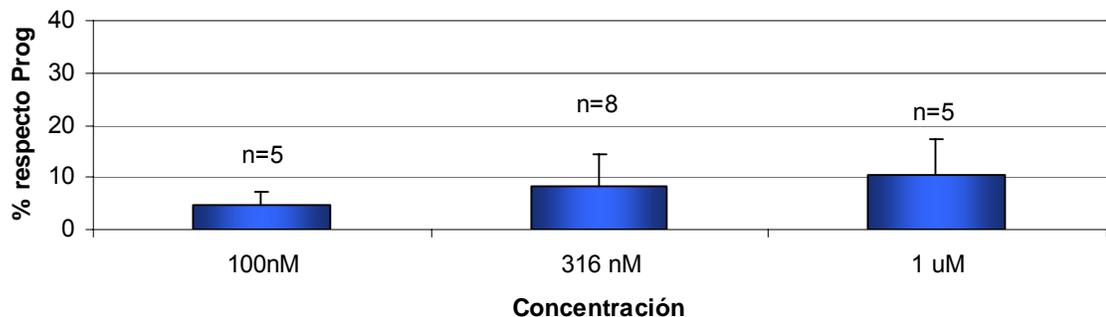


Figura 28. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ de P2' estimulado con 100 msec de luz UV. Se muestran las amplitudes alcanzadas con diferentes concentraciones de P2', en paréntesis se muestra la amplitud que alcanzó el análogo respecto al control (3 μ M de progesterona): 100 nM (5%), 316 nM (8%) y 1 μ M (11%), las cuales no tuvieron diferencia significativa entre su respuesta (* $P < 0.05$). n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones.

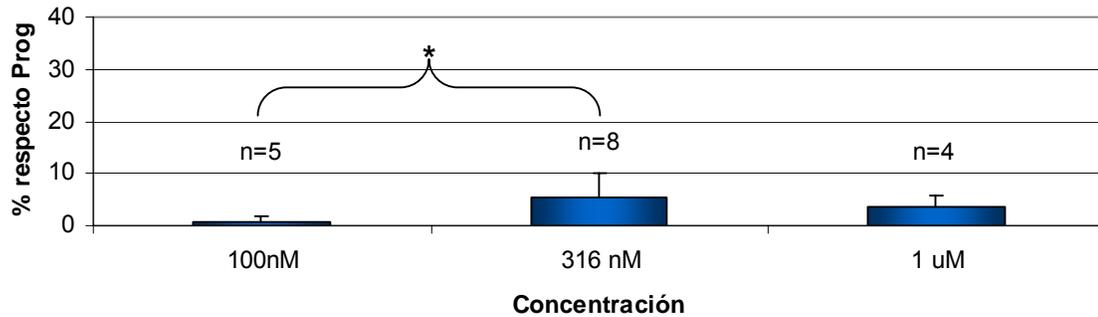


Figura 29. Amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ de P2' estimulado con 50 msec de luz UV. Las amplitudes alcanzadas fueron: con 100 nM, 1%; con 316 nM, 12% y con 1 μ M, 3%, el aumento respecto al control (progesterona 3 μ M). n = número de repeticiones para cada concentración. Las barras de error representan las DS de las distintas concentraciones.

La amplitud de la respuesta de P2' obtenida estimulando con pulsos de 50 y 100 msec es muy pequeña en las distintas concentraciones utilizadas, por lo que no es de utilidad para estudiar el efecto de la progesterona en espermatozoide de humano. En cambio, cuando utilizamos pulsos de 250 y 500 msec el incremento es mayor (mas de 10%) y podemos estudiar la respuesta de las células.

3. Estimación de la concentración de progesterona liberada

Con los datos de la amplitud del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (en porcentaje) y de la curva dosis-respuesta de progesterona, es posible hacer una estimación del porcentaje y de la concentración de progesterona que está siendo liberada después de la fotólisis de los distintos análogos enjaulados con un pulso de luz UV de 500 msec (**Tabla 5**).

Concentración	P1		P2		P2'	
	Prog (nM)	% liberado	Prog (nM)	% liberado	Prog (nM)	% liberado
10 nM			4.1	41.5	3.8	38.3
31.6 nM			3.9	12.4	16.3	51.7

100 nM	7.4	7.4	6.1	6.1	25.4	25.4
316 nM	7.9	2.5	9.8	3.1	19.5	6.2
1 μM	6.2	0.60	8.1	0.80	14.4	1.4
3.16 μM	8.6	0.30	7.0	0.20	5.3	0.20
10 μM	12.4	0.10				
31.6 μM	10.8	0.030				

Se muestran los valores que fueron estimados para el porcentaje y la concentración de progesterona (Prog) liberada después de la fotólisis con un pulso de 500 mseg de luz UV al utilizar P1, P2 y P2'. Para la obtención de estos valores se utilizaron las ecuaciones descritas en materiales y métodos.

P1 es el análogo que muestra menor aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (**Tabla 5**), lo que indica que la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis es baja. Esto puede ser porque después de la fotólisis se libera más de un producto, es decir, ya que P1 posee dos grupos fotoactivables, se puede liberar sólo uno de ellos y quedar en forma de P2 o P2', o si se liberan ambos grupos queda progesterona. Por lo que después de la fotólisis hay una mezcla de P2, P2', progesterona y el conjunto de estos compuestos son los que inducen el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

Respecto a P2, la progesterona liberada es mayor que la de P1, pero menor que P2' (**Tabla 5**). Esto puede explicarse debido a que la fotólisis de este análogo genera otro producto además de la progesterona. Lo que provoca una disminución, tanto en la concentración final de progesterona como en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

Con P2' se registraron los porcentajes y las concentraciones más altas de liberación de progesterona (**Tabla 5**). Al dar el estímulo con luz UV (500 mseg) a P2' en una concentración de 31.6 nM se registra una liberación de ~50% de progesterona (la eficiencia más alta), que equivale a ~16 nM. Sin embargo, aunque sea la eficiencia más alta, se produce una respuesta pequeña ya que desde un inicio se partió de una concentración baja (~31.6 nM). Por otro lado, con 100 nM se liberó ~25% de progesterona, que equivale a ~25 nM y aunque disminuyó la eficiencia a la mitad (respecto 31 nM) es la concentración de progesterona fotoactivada más alta. Al utilizar 316 nM se obtuvo ~20 nM, que es similar a la fotoactivación con 100 nM, pero con un porcentaje mas bajo de liberación: ~6%.

Se hizo la misma estimación para P2' (100 nM, 316 nM y 1 μ M) en distintos tiempos de exposición de luz UV (50-500 mseg) (**Figura 30**). Con estos datos, el porcentaje más alto de liberación fue 25% utilizando 100 nM de P2'. Con la misma concentración y a la mitad del tiempo se obtuvo sólo 5%, es decir, la fotólisis no es igual en todos los casos, considerando que lo esperado era obtener la mitad del producto. En las siguientes concentraciones y con diferentes pulsos, el porcentaje de progesterona liberado es muy bajo. Con 250 mseg se liberó ~5% de progesterona en 100nM, ~3% con 316nM y ~1% con 1 μ M. Con 100 mseg se liberó a las mismas concentraciones ~2.5%, ~1% y ~0.6% respectivamente. Con 50 mseg se fotoactivó ~0.3%, ~0.8% y ~0.2% en las mismas concentraciones. Lo esperado es que se libere el mismo porcentaje de progesterona con el mismo estímulo de tiempo, pero no pasa así, según la estimación realizada.

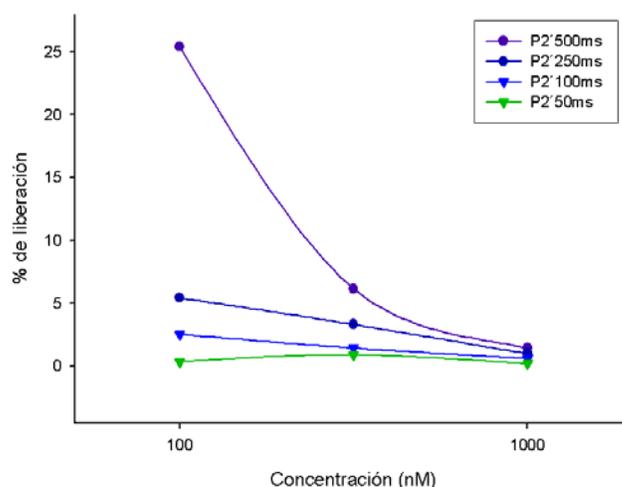


Figura 30. Porcentaje estimado de progesterona liberada con la fotólisis de P2'. Se muestran tres concentraciones de P2' (100 nM, 316 nM y 1 μ M) estimuladas con distinta duración de luz UV. Con 100 nM estimulado con 500 mseg (indigo y círculo) se libera el porcentaje más alto: 25%.

Esperábamos que el porcentaje de liberación aumentara proporcionalmente con el tiempo del estímulo, pero esa relación no se cumple en 100 nM ni en 1 μ M, en cambio, para 316 nM se puede observar la relación esperada: con 500 mseg se libera ~6%, con 250 mseg: ~3%, con 100 mseg: ~1% y con 50 mseg: ~1%. Esta relación lineal se cumple aunque el porcentaje de liberación es muy pequeño en todos los estímulos.

Para seleccionar la condición más eficiente, los datos obtenidos deben analizarse junto con la estimación de la concentración de la progesterona fotoactivada. Estos datos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Estimación del porcentaje y de la concentración de progesterona liberada después de la fotólisis de P2' con distintos pulsos de luz UV								
Concentración	P2'							
	50 mseg		100 mseg		250 mseg		500 mseg	
	Prog (nM)	% liberado						
100 nM	0.3	0.3	2.5	2.5	5.4	5.4	25.4	25.4
316 nM	2.8	0.9	4.5	1.4	10.5	3.3	19.5	6.2
1 µM	1.9	0.2	6.0	0.6	9.9	1.0	14.4	1.4

Se muestran los valores estimados del porcentaje y de la concentración de progesterona (Prog) liberada después de la fotólisis de P2' al utilizar distintas duraciones del pulso de luz UV (50-500 mseg).

En la tabla anterior, así como en la **Figura 30** se observa que no existe una relación lineal entre el porcentaje de liberación de los análogos y el tiempo de estimulación con luz UV. Por otro lado, al disminuir la concentración de P2' y la duración de pulsos de luz UV, se ve disminuida la concentración liberada de progesterona (**Tabla 5**). Ya que se observan incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ tan pequeños no es útil trabajar en estas condiciones (baja concentración de P2' y pulsos de luz UV cortos) porque el cambio en la concentración no es suficiente y no siempre es observable.

4. Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ con alta resolución temporal

P2' fue el análogo con el que se registró el mayor incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoide de humano en población. En esta sección se probaron tres concentraciones de P2' (100 nM, 316 nM y 1 µM) y se estimularon con distintos tiempos de luz UV (100 mseg, 250 mseg y 500 mseg) para conocer la concentración con la cual se puede observar incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (**Tabla 7**).

Tabla 7. Retraso en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ fotoactivando P2' con distintas concentraciones y duraciones del pulso de luz UV		
[P2']	Duración del pulso de luz UV	Retraso (seg) ($P < 0.05$)
100 nM	100 mseg	Nd
	250 mseg	Nd

	500 mseg	2.29
316 nM	100 mseg	2.0
	250 mseg	1.14
	500 mseg	1.47
1 μM	100 mseg	1.55
	250 mseg	0.84
	500 mseg	0.89

Se muestran los retrasos de distintas concentraciones de P2' estimuladas con distinta duración de pulso de luz UV. El retraso es el tiempo a partir del cual los valores entre el control y el trazo con P2' son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). nd = no determinado, en este caso no se observó incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los registros (5 seg).

Las mejores condiciones para estos registros fueron utilizando P2' 1 μM y 250 mseg de luz UV. La **Figura 31** muestra el promedio de 3 registros con alta resolución temporal (200 Hz), en el cual se registró un retraso en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ~800 mseg con 1 μM de P2' ($P < 0.05$). El retraso es el tiempo a partir del cual hay diferencia significativa entre el trazo control y el experimental.

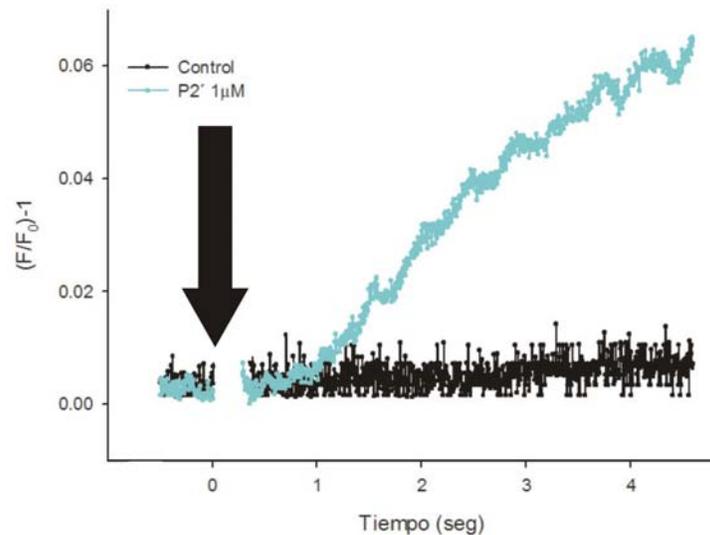


Figura 31. Cinética del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por P2' (1 μM) con alta resolución temporal (200 Hz). Se muestra el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizando el análogo P2' en concentración 1 μM (azul), el estímulo es de 250 mseg de exposición de luz UV. En negro se encuentra el control, el cual consiste en células cargadas con Fluo3, sin adición de análogo enjaulados. El retraso que se observó fue de ~800 mseg. Trazo promedio de 3 experimentos.

Estos resultados son de gran importancia, ya que este retraso indica que hay una vía de señalización entre la unión de la progesterona a su receptor y la apertura de un canal de Ca^{2+} antes de permitir la entrada de este ión a la célula. Si

el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ hubiera sido inmediato, se podría decir que el receptor está acoplado directamente a un canal de Ca^{2+} .

VIII. DISCUSIÓN

1. Evaluación de los tres análogos de progesterona

En este trabajo se realizó una evaluación de estos tres análogos fotoactivables de progesterona, denominados P1, P2 y P2'. Como se mencionó anteriormente, se definen ciertos parámetros para decir que un compuesto fotoactivable es útil. Entre estas características se encuentran las siguientes (Ellis-Davies, 2003):

- Tener una actividad basal baja. El compuesto fotosensible "ideal" debe ser inactivo antes de la fotólisis, es decir, no debe ser ni antagonista ni agonista cuando se añade a la preparación biológica. En una concentración adecuada, no debe causar ningún efecto.
- En el caso de querer estudiar procesos con alta resolución temporal, la tasa de liberación del compuesto necesita ser más rápida que la duración de la activación del proceso en estudio.
- Tener una fotólisis eficiente, ya que mientras mayor es la eficiencia de liberación, es más fácil usar el compuesto fotoactivable. Cabe mencionar que en algunos casos, los compuestos fotosensibles con eficiencias de liberación medianas también pueden utilizarse (dependiendo del proceso biológico en estudio y las preguntas que se quieran responder).

Al realizar la evaluación de la actividad antes de la fotólisis de los tres análogos, y de la progesterona se observó que la actividad basal mas baja corresponde a P1 (**Figura 17**). De hecho, este análogo no alcanza el 50% de la respuesta respecto a la curva de progesterona. P1 posee dos grupos fotosensibles (C3 y C20) (**Figura 11**), los cuales pueden de estar inhibiendo la interacción de la molécula con el receptor de progesterona membranal.

Por otro lado, P2 y P2' poseen actividades basales más altas. P2 (el análogo con una modificación en el C3) (**Figura 11**) alcanza el 50% de respuesta respecto a progesterona con 640 nM, el EC_{50} de progesterona es 50 nM, por lo que P2 disminuyó su actividad ~12 veces respecto a la actividad de progesterona (**Figura 18**). El análogo P2' (con una modificación en el C20) (**Figura 11**)

disminuyó su actividad ~8 veces y alcanza el 50% de respuesta respecto a progesterona con 420 nM (**Figura 19**).

Como observamos en las actividades basales, al modificar sólo una posición (como en el caso de P2 y P2'), todavía hay incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, pero al modificar los dos sitios (como P1), la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye casi totalmente. Por lo que el efecto de inhibición con las dos modificaciones es sinérgico, ya que la actividad de P1 respecto a la de la progesterona disminuye ~1,000 veces y las otras ~8 (P2') y ~12 (P2) veces. Esto sugiere que el receptor membranal de progesterona, aun desconocido, puede estar reconociendo una parte grande de la molécula, es decir puede reconocer al menos tres de los cuatro anillos que conforman la molécula de progesterona. Tomando en cuenta un estudio en el cual probaron mas de 100 esteroides para conocer la especificidad del receptor membranal de progesterona de espermatozoide de humano (Blackmore et al., 1996), la modificaciones en el C3 con un OH en configuración α y β , no causa efecto en el aumento del Ca^{2+} intracelular. En el C20 se hicieron más cambios con distintos grupos funcionales (fluor, metil, OH, acetil), que al estar en conjunto con al menos dos modificaciones, cambiaron el compuesto de ser agonista a antagonista. Por lo anterior consideramos que no se puede decir que la modificación de un solo carbono sea capaz de disminuir la entrada de Ca^{2+} a la célula. Esto nos podría sugerir que el receptor de progesterona membranal no puede discernir entre ciertos de los miembros de la familia de los esteroides.

Es importante mencionar que las modificaciones se hicieron en los C3 y C20 de la progesterona porque en estos sitios hay un oxígeno con el que se puede llevar a cabo la reacción para la adición del grupo fotosensible.

Tomando en cuenta la primera parte de la evaluación, P1 es el análogo con actividad basal más baja, y se podría clasificar como el análogo más adecuado, considerando sólo una propiedad de los compuestos enjaulados "ideales" (anteriormente mencionada). Sin embargo se necesita cumplir con más características, como que la fotólisis sea eficiente en un tiempo corto de luz UV, es decir, que la modificación sea lábil a la luz UV. Además se necesita liberar únicamente progesterona; que sus productos no causen efectos tóxicos en la

célula y que sean mínimos, entre otros. Por otro lado, P2 y P2' poseen actividades basales más altas que P1, pero aun así se pueden utilizar si la fotólisis es eficiente.

El siguiente paso de la evaluación fue medir el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ tras la fotoactivación de los análogos. Partiendo de que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ es proporcional a la liberación de progesterona en el medio. Se midió la amplitud de la respuesta (aumento de la $[Ca^{2+}]_i$) de los análogos fotoactivables y se comparó con el control de 3 μ M de progesterona. El análogo que presentó la mayor amplitud de respuesta en un rango de 3 nM a 1 μ M y con una iluminación de luz UV de 500 msec fue P2' (100 nM, 32%, inducción de la máxima respuesta). La mayor amplitud alcanzada por P2 (316 nM, 500 msec) es de 16%, la cual corresponde a la mitad de la amplitud máxima alcanzada por P2' con 100 nM. Por lo tanto, el mayor incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se obtiene al fotoactivar P2'.

Al comparar la respuesta de los tres análogos después de la fotólisis, observamos que P1 y P2 presentan una cinética diferente a la de P2' y progesterona. P1 y P2 tardan más que P2' en llegar al pico máximo y la amplitud de respuesta de los primeros es menor. Al medir $t/2$ observamos que P1 tarda más en llegar al pico máximo respecto a P2 y P2' en todas las concentraciones. Al comparar el $t/2$ de P2 y P2', observamos que P2 tarda mas que P2' en llegar al pico, excepto con 316 nM, donde P2 es más rápido, pero la amplitud de P2' es significativamente mayor ($P < 0.05$) que la de P2. Por lo tanto, el análogo P2' fotoactivado tiene el comportamiento más similar al de progesterona (en cuanto a cinética se refiere).

Estas diferencias en la cinética posiblemente se deben a la liberación de productos secundarios inespecíficos por P2 en el proceso de fotólisis (comunicación personal con el Dr. Tatsu). Estos productos deben ser liberados también por P1 ya que posee la misma modificación en el C3 con el grupo nitrobenzil. En el caso de P2, después de la fotólisis se están liberando progesterona y el producto secundario. Este producto, debe ser similar a la progesterona, pero con alguna modificación en los enlaces cercanos a la modificación. Esta molécula puede funcionar como antagonista al no permitir que la señal que induce la entrada de Ca^{2+} sea transmitida a la célula (**Figura 32**). Por lo tanto, en el registro de fluorescencia, después de la fotólisis, observamos el

efecto que tiene el producto secundario y la progesterona en conjunto, sobre la célula. Eso puede explicar que la cinética de P2 sea diferente a la de P2'.

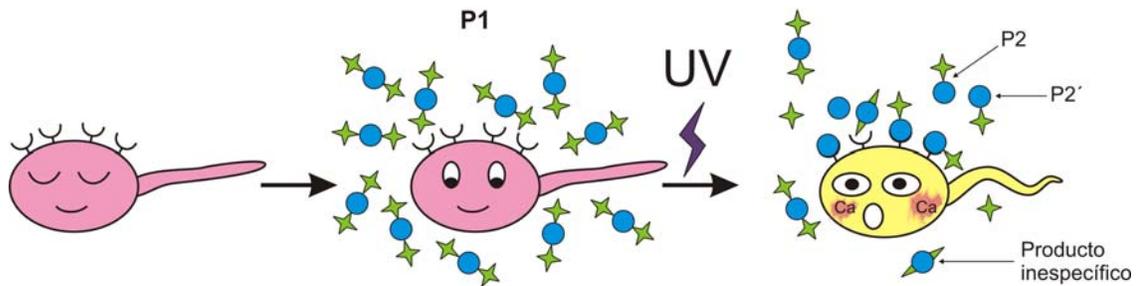


Figura 32. Estimulación con el análogo P1. La estimulación de los espermatozoides con P1 no induce incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la fotólisis. Sin embargo al fotoactivar este análogo se producen otros compuestos además de progesterona que probablemente funcionen como antagonistas y no permiten que la señal de la progesterona se transmita a la célula.

Al analizar el comportamiento de P1, observamos que después de la fotólisis se pueden liberar varios productos, una parte es de progesterona, pero también debe haber P2 y P2', en el caso que sólo un grupo fotosensible se haya desprendido. Además también se deben liberar los productos inespecíficos, por la presencia de la modificación en el C3. Por lo tanto, en los registros de P1 y P2 observamos el efecto inducido por todas las moléculas anteriores en la $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 32**). Es muy probable que por esto la cinética difiere de la progesterona y la múltiple cantidad de productos liberados pueden influir para que el $t/2$ sea mayor que con los otros dos análogos.

Otro dato importante es que la $[Ca^{2+}]_i$ continua en aumento a medida que P1 es estimulada con más pulsos de luz UV. Esto puede ser porque en el primer pulso se liberó poca concentración de progesterona y en los pulsos subsecuentes hay más liberación de esta molécula que puede ocupar los receptores que quedaron libres. Respecto a P1, pensábamos que se podía necesitar más energía (pulsos más largos de 500 mseg) para liberar más progesterona, esto podría ser factible en el caso de estimulación local en estudios en microscopia, es decir, aplicar un pulso de luz UV de larga duración dirigido a una región carente de células. Lo anterior permitiría crear un gradiente de progesterona y evitar el daño a las células debido al pulso de larga duración. Sin embargo, al tomar en cuenta la liberación del producto secundario inespecífico, probablemente habría liberación de éste. La liberación de productos secundarios resulta en una mezcla de productos que funcionan como agonistas y antagonistas que inducirían un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ con una cinética diferente a la de la progesterona. Por lo

tanto el método de iluminación continua de P1 no serviría para estudios en célula única (microscopía) ni para población (fluorimetría), como ya lo observamos.

Al graficar las amplitudes de los tres análogos, podemos observar que el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ es bajo en concentraciones pequeñas; en concentraciones intermedias la respuesta aumenta, pero en concentraciones altas, la amplitud disminuye. Sin embargo, es importante tomar en cuenta la estimación del porcentaje de liberación de progesterona (**Tabla 6**), que resultó ser alto en bajas concentraciones de P2'. Por lo que no estamos observando la liberación de progesterona real ya la estimación se sacó de los datos de la amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$, es decir un método indirecto.

Por otro lado, en las gráficas de la actividad basal se puede observar que hay cierta actividad residual, es decir, la $[Ca^{2+}]_i$ está más arriba del basal antes del estímulo con luz UV, para el caso de P2 y P2'. Sin embargo, para el caso de P1, no hay tal incremento. Esto sugiere que hay ocupación de receptores antes de la fotoactivación de P2 y P2', lo que induce que la $[Ca^{2+}]_i$ incremente, sin embargo después de un tiempo la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye, pero no se recupera hasta la basal (antes del estímulo con P2 o P2').

Tomando en cuenta la actividad basal de P2', se observó que mientras más alta es la concentración del análogo enjaulado la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa, lo que sugiere que hay menos receptores disponibles para la progesterona después de la fotoactivación. Debido a esto, altas concentraciones de P2' (1 μ M) presentan menor amplitud que las concentraciones intermedias (316 nM).

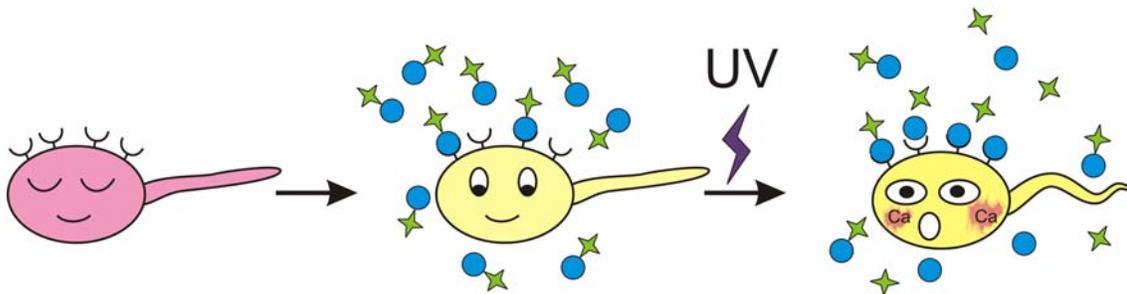


Figura 33. Estimulación con el análogo P2'. P2' ocupa los receptores de progesterona y es capaz de inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ antes de la fotólisis. Después de la incubación con P2' se fotoactiva P2', se libera progesterona y es posible inducir de nuevo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

Al disminuir los tiempos de exposición de luz UV utilizando la misma concentración de P2' se esperaba que la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ disminuyera proporcionalmente. Solo con 100 mseg de irradiación con luz UV se encontró esta relación. Probablemente lo anterior no se cumplió porque a pesar de haber liberación de progesterona, no hay incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, posiblemente por desensibilización. En este punto hay que recordar que nosotros estimamos la progesterona liberada con el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, es decir, utilizamos un método indirecto. Tomando en cuenta lo anterior, la respuesta que se puede obtener a altas concentraciones de P2' es menor porque el número de receptores disponibles disminuye ya que están siendo ocupados por P2' (antes de la fotólisis) y cuando se estimula con luz UV para promover la liberación de progesterona, solo responden los receptores que quedaron disponibles (los que no ocupó P2') y el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es de menor amplitud comparado con el inducido con concentraciones menores. Esto se podría verificar haciendo adiciones sucesivas de progesterona sin modificar.

P2' es el análogo que presenta una cinética mas similar a la de la progesterona, además casi no hubo aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los pulsos subsecuentes (500 mseg), lo que indica que casi todos los receptores de progesterona son ocupados después del primer pulso. El análogo P2' resultó ser el mejor en esta evaluación para estudios en población. A pesar de tener una actividad basal alta, la respuesta obtenida después de la fotólisis es la de mayor amplitud y la más similar a la de la cinética de progesterona (hay que recordar esta respuesta se obtiene después de incubar 5 min con el análogo enjaulado). Nosotros proponemos que este análogo no forma productos secundarios que afecten la respuesta, como pudiera ser el caso de P2 y P1. En particular la concentración 100 nM de P2', que alcanza la amplitud más alta (porcentaje estimado de liberación de 25%) y presenta una cinética muy similar a la de la progesterona sin modificaciones, por lo que es un candidato de gran utilidad para estudios en población. Sin embargo, se puede verificar la existencia o no productos secundarios haciendo un análisis de los productos después de la fotólisis, una posibilidad es con el equipo HPLC, que se utilizó anteriormente para detectar los productos secundarios de P2.

Es importante mencionar que a pesar de la actividad basal alta de P2', es posible utilizar este análogo en estudios de población, ya que se encontró un rango de concentración adecuado, en el cual la eficiencia de la fotoactivación es alta. Además la duración del pulso de luz UV utilizado para activarlo no incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ por si mismo.

Por otro lado, la curva dosis-respuesta de P2' (**Figura 19**), parece estar compuesta por dos curvas sigmoides. Los compuestos fotoactivables (P2 y P2') poseen dos carbonos quirales por lo que la curva puede ser el reflejo de la actividad de los diasterómeros. En este caso, el receptor podría tener preferencia por alguno de estos compuestos y uno de estos podría tener una actividad basal más baja. En este sentido, se podrían separar los compuestos y posteriormente determinar la actividad basal de cada uno con una curva dosis-respuesta. Con esta separación se podría conocer un poco más sobre la identidad del receptor de progesterona y se podría elegir una molécula con actividad basal más baja. Para optimizar realmente las características de P2', también sería necesario que el compuesto sea capaz de inducir un incremento en el Ca^{2+} intracelular después de la fotólisis

2. Cinética rápida del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona

Después de hacer la evaluación se utilizó P2' para registrar con alta resolución temporal (200 Hz) el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 31**). Se escogieron tres concentraciones de P2' para estimularlos con distintos pulsos de luz UV y determinar el tiempo donde comienza el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El tiempo que tomó en iniciar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue de ~800 mseg con 1 μ M de P2' después de la fotoactivación (200 mseg), este tiempo es más corto que el valor reportado (Bedu-Addo et al., 2007) de 2 seg para progesterona. De cualquier forma este valor sugiere que hay un proceso de señalización antes de la apertura del canal; si fuera el caso de que el receptor de progesterona estuviera acoplado a un canal de calcio, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ sería inmediato.

Esta entrada de Ca^{2+} externo puede ser el inicio de la modulación de la movilidad en el espermatozoide de humano. Como ya se ha reportado, la

progesterona induce la movilidad hiperactivada en el espermatozoide de humano (Jaiswal et al., 1999). En la RA también es necesaria la entrada de Ca^{2+} externo y se sabe que la progesterona es un inductor fisiológico de la RA (Harper et al., 2004; Kirkman-Brown et al., 2002) por lo que esta entrada de Ca^{2+} también puede ser la señal inicial de la inducción de la reacción acrosomal por progesterona.

El tiempo que tomó para iniciar el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sugiere la existencia de una vía de señalización que precede la apertura del canal de Ca^{2+} . Lo que apoya la participación de proteínas, como PKC, en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual ha sido reportado anteriormente (Foresta et al., 1995). Además, en modelos de ratón, se ha reportado la hidrólisis de PIP_2 (Thomas and Meizel, 1989), así como disminución de la RA inducida por progesterona con inhibidores de PLC y PLA2 (Pietrobon et al., 2005). Estas evidencias, junto con el retraso en el incremento en el Ca^{2+} intracelular obtenido en este trabajo, podrían sugerir la participación de una proteína G, que al ser estimulada, desencadena una cascada de señalización que posteriormente estimularía la apertura de un canal de Ca^{2+} .

Recientemente se reportó la caracterización de una nueva familia de receptores membranales de esteroides en una trucha manchada (*Cynoscion nebulosus*), que incrementan de manera rápida (segundos) la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de progesterona y otros esteroides similares. Este receptor posee siete segmentos transmembranales como los receptores acoplados a proteínas G, es sensible a la toxina de *pertusis* y se encuentra en el cerebro, tejidos reproductivos y endócrinos (Zhu et al., 2003b). Posteriormente se encontraron tres grupos de genes homólogos (α , β , y γ) en humanos con estas mismas características. Los supuestos receptores del grupo α se encuentran en tejidos reproductivos (Zhu et al., 2003a), lo que apoya nuestra hipótesis.

En este trabajo se probó que $\text{P2}'$ (desde 100 nM a 1 μM) es útil para estudios en población, ya que su fotólisis incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides de humano. Este análogo se puede utilizar también en estudios con células individuales utilizando microscopía para conocer con mayor resolución temporal la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona y su relación con la movilidad. En este sentido la progesterona fotoactivable tiene muchas ventajas ya que evitaría los artefactos de adición de compuestos a las células en movimiento,

por lo que es una herramienta muy útil para el estudio de la movilidad en espermatozoide. Además, se tiene la ventaja de conocer el tiempo exacto de la activación, entonces se podría registrar el momento en el que la $[Ca^{2+}]_i$ comienza a aumentar y los cambios subsecuentes para poder relacionarlos con la modulación de la movilidad y otros fenómenos.

IX. CONCLUSIONES

El análogo P1 presentó la actividad basal más baja (~1000 veces menor que la progesterona), sin embargo su fotoactivación es poco eficiente y produce una combinación de productos que no inducen incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ como la progesterona.

El análogo P2 tiene ~12 actividad que la de progesterona, sin embargo, después de la fotoactivación produce productos secundarios inespecíficos además de la progesterona. Lo anterior resulta en un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ con una cinética mas lenta respecto a la de la progesterona.

El análogo P2' es el que resultó con mejor actividad después de la fotólisis a pesar de tener actividad basal alta, en estudios de población. En particular, 100 nM de P2', presentó la mayor amplitud de respuesta (~30%).

En los estudios de alta resolución temporal, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se observa ~800 mseg después de la fotoactivación con P2' (1 μ M). Lo anterior nos indica que el receptor de progesterona no está acoplado directamente a un canal de Ca^{2+} , ya que en ese caso el incremento sería inmediato. Por lo que este resultado sugiere pasos intermedios entre la interacción ligando-receptor y la apertura del canal.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y. and Okamoto, H.** (2001). Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nat Genet* **28**, 317-25.
- Bedu-Addo, K., Barratt, C. L., Kirkman-Brown, J. C. and Publicover, S. J.** (2007). Patterns of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* **302**, 324-32.
- Blackmore, P. F.** (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* **5**, 531-8.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R. and Alexander, N.** (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* **265**, 1376-80.
- Blackmore, P. F. and Eisoldt, S.** (1999). The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **5**, 498-506.
- Blackmore, P. F., Fisher, J. F., Spilman, C. H. and Bleasdale, J. E.** (1996). Unusual steroid specificity of the cell surface progesterone receptor on human sperm. *Mol Pharmacol* **49**, 727-39.
- Blackmore, P. F., Neulen, J., Lattanzio, F. and Beebe, S. J.** (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* **266**, 18655-9.
- Butlin, R.** (2002). Evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nat Rev Genet* **3**, 311-7.
- Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J. J., Hernandez-Cruz, A. and Trevino, C. L.** (2006). T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium* **40**, 241-52.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Trevino, C. L., Felix, R. and Beltran, C.** (2005). Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* **243**, 79-172.
- Darszon, A., Trevino, C. L., Wood, C., Galindo, B., Rodriguez-Miranda, E., Acevedo, J. J., Hernandez-Gonzalez, E. O., Beltran, C., Martinez-Lopez, P. and Nishigaki, T.** (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 229-44.
- Eddy, E. M. and O'brian, D. A.** (1994). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, vol. 1 (ed. E. Knobil and J. D. Neil), pp. 29-77. New York: Raven Press.
- Ellis-Davies, G. C.** (2003). Development and application of caged calcium. *Methods Enzymol* **360**, 226-38.
- Ellis-Davies, G. C.** (2007). Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* **4**, 619-28.
- Foresta, C., Rossato, M. and Di Virgilio, F.** (1993). Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J* **294 (Pt 1)**, 279-83.
- Foresta, C., Rossato, M. and Di Virgilio, F.** (1995). Differential modulation by protein kinase C of progesterone-activated responses in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 408-13.

- Garcia, M. A. and Meizel, S.** (1999). Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol Reprod* **60**, 102-9.
- Gilbert, S. F.** (2006). *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Unates, D. R., Anastasia, A. and Giojalas, L. C.** (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS ONE* **3**, e3040.
- Guzman-Grenfell, A. M. and Gonzalez-Martinez, M. T.** (2004). Lack of voltage-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterone in human sperm. Effect of calcium channel deactivation and inactivation. *Journal of Andrology* **25**, 117-122.
- Harper, C. V., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2004). Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* **279**, 46315-25.
- Harper, C. V., Cummerston, J. A., White, M. R., Publicover, S. J. and Johnson, P. M.** (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci* **121**, 2130-5.
- Harper, C. V., Kirkman-Brown, J. C., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2003). Encoding of progesterone stimulus intensity by intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in human spermatozoa. *Biochem J* **372**, 407-17.
- Ho, H. C. and Suarez, S. S.** (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* **68**, 1590-6.
- Jaiswal, B. S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. and Eisenbach, M.** (1999). Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? *Biol Reprod* **60**, 1314-9.
- Kaplan, J. H., Forbush, B., 3rd and Hoffman, J. F.** (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* **17**, 1929-35.
- kaupp, B., Kashikar, N. and Weyand, I.** (2007). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual Review of Physiology* **70**, 21.1-21.25.
- Kirkman-Brown, J. C., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2003). Nifedipine reveals the existence of two discrete components of the progesterone-induced $[Ca^{2+}]_i$ transient in human spermatozoa. *Dev Biol* **259**, 71-82.
- Kirkman-Brown, J. C., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2004). Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem J* **378**, 827-32.
- Kirkman-Brown, J. C., Bray, C., Stewart, P. M., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2000). Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* **222**, 326-35.
- Kirkman-Brown, J. C., Punt, E. L., Barratt, C. L. and Publicover, S. J.** (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* **23**, 306-15.
- Lin, W., Albanese, C., Pestell, R. G. and Lawrence, D. S.** (2002). Spatially discrete, light-driven protein expression. *Chem Biol* **9**, 1347-53.
- Losel, R., Breiter, S., Seyfert, M., Wehling, M. and Falkenstein, E.** (2005). Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* **37**, 10-4.
- Makler, A.** (1978). A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril* **30**, 313-8.

- Makler, A., Murillo, O., Huszar, G., Tarlatzis, B., DeCherney, A. and Naftolin, F.** (1984). Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory method. *Int J Androl* **7**, 61-70.
- Marriott, G.** (1994). Caged protein conjugates and light-directed generation of protein activity: preparation, photoactivation, and spectroscopic characterization of caged G-actin conjugates. *Biochemistry* **33**, 9092-7.
- Mayer, G. and Heckel, A.** (2006). Biologically active molecules with a "light switch". *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 4900-21.
- Meizel, S., Turner, K. O. and Nuccitelli, R.** (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* **182**, 67-75.
- Milburn, T., Matsubara, N., Billington, A. P., Udgaonkar, J. B., Walker, J. W., Carpenter, B. K., Webb, W. W., Marque, J., Denk, W., McCray, J. A. et al.** (1989). Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry* **28**, 49-55.
- MolecularProbes.** (2005). Fluo Calcium Indicators, (ed., pp. 5.
- MolecularProbes.** (2008). Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters, (ed., pp. 3.
- Monroe, W. T., McQuain, M. M., Chang, M. S., Alexander, J. S. and Haselton, F. R.** (1999). Targeting expression with light using caged DNA. *J Biol Chem* **274**, 20895-900.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D. and Meizel, S.** (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 828-33.
- Pietrobon, E. O., Soria, M., Dominguez, L. A., Monclus Mde, L. and Fornes, M. W.** (2005). Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol Reprod Dev* **70**, 58-63.
- Sabeur, K., Edwards, D. P. and Meizel, S.** (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* **54**, 993-1001.
- Suarez, S. S.** (1996). Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* **17**, 331-5.
- Suarez, S. S.** (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*.
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B. and Powell, R. L.** (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* **44**, 375-81.
- Tesarik, J., Moos, J. and Mendoza, C.** (1993). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* **133**, 328-35.
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W. and Giojalas, L. C.** (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* **86**, 745-9.
- Thomas, P. and Meizel, S.** (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca²⁺ influx. *Biochem J* **264**, 539-46.
- Turner, K. O. and Meizel, S.** (1995). Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 774-80.
- Turner, R. M.** (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* **18**, 25-38.

- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. and Diekman, A. B.** (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* **53**, 133-50.
- Walker, J. W., Gilbert, S. H., Drummond, R. M., Yamada, M., Sreekumar, R., Carraway, R. E., Ikebe, M. and Fay, F. S.** (1998). Signaling pathways underlying eosinophil cell motility revealed by using caged peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1568-73.
- Walker, J. W., Somlyo, A. V., Goldman, Y. E., Somlyo, A. P. and Trentham, D. R.** (1987). Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **327**, 249-52.
- Wassarman, P. M.** (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* **204**, 388-91.
- Wassarman, P. M. and Albertini, D. F.** (1994). The Mammalian Ovum. In *The Physiology of Reproduction*, vol. 1 (ed. E. Knobil and J. D. Neil), pp. 79-122. New York: Raven Press.
- WHO.** (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press.
- Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K. and Hess, G. P.** (1994). Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8752-6.
- Wistrom, C. A. and Meizel, S.** (1993). Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* **159**, 679-90.
- Yanagimachi, R.** (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, vol. 1 (ed. E. Knobil and J. D. Neil), pp. 189-317. New York: Raven Press.
- Zhu, Y., Bond, J. and Thomas, P.** (2003a). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2237-42.
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. and Thomas, P.** (2003b). Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2231-6.
- Zou, K., Cheley, S., Givens, R. S. and Bayley, H.** (2002). Catalytic subunit of protein kinase A caged at the activating phosphothreonine. *J Am Chem Soc* **124**, 8220-9.