



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio del canal de K^+ Slo3 específico del espermatozoide de mamíferos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR SÁNCHEZ CARRANZA

DIRECTOR DE TESIS: IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ



México, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Oscar
Sánchez
Carranza
55 13 75 57 60
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306248597

2. Datos del tutor

Dr.
Ignacio
López
González

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Pilar
Durán
Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Rita Maria
Restano
Cassulini

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Roberto Carlos
Muñoz
Garay

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Viviana del Carmen
Valadez
Graham

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio del canal de K⁺ hSl α 3 específico del espermatozoide de mamíferos.

89 p.
2013

A mi familia, por el apoyo que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, José Juan, Sandra, Adriana y José Juan (Jr.), porque me apoyaron y me impulsaron en cada momento. Su esfuerzo también se refleja en este trabajo.

A Daniel, mi artista favorito. Por pintar mis días con sus pinceladas de alegría.

Al Dr. Ignacio López González, por haberme incursionado y apoyado para el desarrollo y conclusión de este proyecto de investigación. Su comprensión y paciencia es incomparable.

Al Dr. Alberto Darszon, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Claudia Treviño y al Dr. Takuya Nishigaki, porque su orientación fue indispensable para mi formación en el ámbito científico.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: David, Sofía, Iván, Nadia, Kenia, Mauricio, Pablo, Marcela, por haber compartido momentos inolvidables durante mi estancia en la facultad.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Omar, Tatiana, Paulina, Yolo, Francisco, Carmen, Aura, Alejandra, Dra. Carmen, Enrique, Juan, Dulce, Anita, Arlet, Espe, Verito, José Luis, Ana Laura, Gerardo al Sr. Toño y al Sr. Miguel, por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado: Dra. Pilar Durán Hernández, Dra. Rita Maria Restano Cassulini, Dr., Ignacio López González, Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay y Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham, por sus observaciones, ideas y comentarios que ayudaron a mejorar este escrito.

Este trabajo se realizó en el laboratorio número dieciséis del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la asesoría del Dr. Ignacio López González. Oscar Sánchez Carranza recibió apoyo para la realización de la tesis de licenciatura del donativo CONACyT-México (84362 para I. L. G) y DGAPA/UNAM (IN202212-3 para C. T.)

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Fecundación en mamíferos.....	2
2.2. Espermatogénesis.....	4
2.1. El espermatozoide.....	5
2.2. Movilidad.....	8
2.3. Capacitación e hiperactivación en el tracto genital femenino (TGF).....	8
2.4. Reacción Acrosomal.....	13
2.5. Generalidades de los canales de K ⁺	14
2.6. Canales de K ⁺ de la familia Slo.....	16
2.6.1. Canales Slo1.....	16
2.6.2. Canales Slo2.....	18
2.6.3. Canales Slo3.....	19
3. Antecedentes.....	20
3.1. Función del canal Slo3 en la fecundación del ratón.....	20
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	24
6. Objetivos.....	25
6.1. Objetivos Generales.....	25
6.2. Objetivos particulares.....	25
7. Materiales y métodos.....	26
7.1. Obtención de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX.....	26
7.2. Análisis de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por patrones de digestión y secuenciación.....	26
7.2.1. Verificación de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por patrones de digestión	26
7.2.2. Verificación de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por secuenciación.	27
7.3. Purificación de ADN a partir de gel de Agarosa.....	28
7.4. Extracción de ADN plasmídico con Miniprep.....	29
7.5. Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....	30
7.6. Preparación de células quimiocompetentes DH5α.....	30
7.7. Transformación de E. coli quimiocompetentes DH5α.....	31

7.8.	Electroforesis de ADN	31
7.9.	Secuenciación de ADN.....	32
7.10.	Subclonación de los genes que codifican para los canales de K ⁺ hSlo3 y mSlo3 en el vector de expresión pCDNA3.1 (-).....	32
7.10.1.	Inserción del sitio HindIII al gen que codifica para el canal hSlo3.....	32
7.10.2.	Digestión del inserto y vector	33
7.10.3.	Ligación de los genes que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 con el vector de expresión pcDNA 3.1 (-)	35
7.10.4.	Transformación de productos de ligación.....	35
7.10.5.	Verificación de las construcciones	35
7.11.	Cultivo y transfección de células CHO.....	35
7.11.1.	Cultivo y pase de células CHO.	36
7.11.2.	Transfección de células CHO	36
7.12.	Ensayos de determinación de potencial de membrana en reposo en población de células CHO	37
7.12.1.	Preparación de células CHO para los ensayos de fluorometría.	38
7.12.2.	Titulación del potencial de membrana en reposo	38
7.13.	Obtención de Anticuerpos αSlo3	39
7.14.	Inmunocitoquímicas.....	39
7.15.	Reversión de mutaciones A2216G y C2302T	41
8.	Resultados.....	42
8.1.	Verificación de la identidad y la integridad molecular de las clonas que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3.....	42
8.2.	Subclonación de los canales hSlo3 y mSlo3 en el vector de expresión pcDNA 3.1 (-).49	
8.3.	Obtención de Anticuerpo αSlo3 e inmunolocalización de los canales Slo3.....	52
8.3.1.	Inmunolocalización en células CHO	54
8.3.1.	Inmunolocalización de los canales Slo3 endógenos del espermatozoide de ratón.	57
8.1.	Demostración de la expresión funcional de los canales Slo3 por determinación del potencial de reposo en las células CHO.	59
8.1.	Reversión de mutaciones A2216G y C2302T	62
9.	Discusión	68
10.	Conclusiones.....	74
11.	Perspectivas.....	76
12.	Apéndice	77
12.1.	Amplificación del canal hSlo3 por PCR.....	77

12.2.	Amplificación del fragmento 3 hSlo3 – A2216G por PCR.....	77
12.3.	Amplificación del fragmento A2216G+ – A hSlo3 por PCR.	78
12.4.	Amplificación del fragmento Reversión de mutación A2216G por PCR.	79
12.5.	Amplificación del fragmento 3 hSlo3 – C2302T por PCR.	79
12.6.	Amplificación del fragmento C2302T+ – A hSlo3 por PCR.	80
12.7.	Amplificación del fragmento Reversión de mutación A2216G y C2302T por PCR..	81
12.8.	Amplificación del fragmento A2216G+ – C2302T por PCR.	81
12.9.	Amplificación del fragmento T3 - C2302T por PCR.	82
12.10.	Amplificación del fragmento A2216G+ - T7 por PCR	82
12.11.	Amplificación del fragmento T3 - T7 con reversiones A2216G y C2302T por PCR .	83
13.	Referencias	85

Índice de Figuras:

Figura 1: Fecundación en mamíferos.....	3
Figura 2: Espermatogénesis.....	6
Figura 3: Morfología del espermatozoide de mamífero.....	7
Figura 4: Movilidad del espermatozoide de mamífero.....	10
Figura 5: Flujos iónicos durante la movilidad hiperactivada y la capacitación.....	12
Figura 6: Canales de Potasio de la familia Slo.....	17
Figura 7: Mapa de las construcciones hSlo3-pOX (A) y mSlo3-pOX (B).....	42
Figura 8: Patrón de digestión de la construcción hSlo3-pOX.....	43
Figura 9: Patrón de digestión de la construcción mSlo3-pOX.....	45
Figura 10: Alineamiento entre mSlo3-GeneBank y mSlo3-Secuencia armada.....	46
Figura 11: Mutación C771T.....	47
Figura 12: Mutaciones A2216G y C2302T.....	47
Figura 13: Alineamiento entre hSlo3 - GeneBank y hSlo3 - Secuencia armada.....	48
Figura 14: Inserción del sitio HindIII en hSlo3.....	50
Figura 15: Digestiones del vector pcDNA 3.1 (-) y de la construcción mSlo3-pOX.....	50
Figura 16: Los patrones de digestión de las construcciones Slo3- pcDNA 3.1 (-) confirman la ligación correcta del vector con los canales.....	51
Figura 17: Secuencias de aminoácidos de los canales Slo3 en el vector pcDNA 3.1 (-).....	51
Figura 18: La secuencia peptídica seleccionada es específica de los canales Slo3.....	53
Figura 19: Las células CHO sin transfectar no expresan epítopes reconocidos por el Ab 1° U1493, el anticuerpo 2° o el suero preinmune.....	55
Figura 20: El canal hSlo3 se expresa en la membrana plasmática de las células CHO.....	56
Figura 21: El canal mSlo3 se expresa en la membrana plasmática de las células CHO.....	58
Figura 22: El canal Slo3 se localiza en la región acrosomal de la cabeza y en las piezas media y principal del flagelo del espermatozoide de ratón.....	60
Figura 23: Em _{rep} de las células CHO.....	63
Figura 24: PCRs para revertir la mutación A2216G.....	64
Figura 25: Secuencia armada de hSlo3 con reversión de la mutación A2216G.....	65
Figura 26: PCRs para revertir la mutación C2302T.....	65
Figura 27: PCR para la obtención de A2216G+-C2302T.....	66
Figura 28: PCR para la obtención de A2216G+-T7 y T3-C2302T.....	67
Figura 29: PCR para la obtención de las reversiones A2216G y C2302T.....	67

1. Resumen

La fecundación en animales de reproducción sexual consiste en la fusión del espermatozoide y del ovocito, en este proceso participan distintos transportadores y canales iónicos presentes en estos gametos. En el caso del gameto masculino, el gen *slo3* o *kcnu1* codifica para un canal de K^+ dependiente de voltaje y pH que sólo se expresa en células de esta línea germinal. Estudios en el ratón *knockout* del canal Slo3 demuestran que los espermatozoides nulos tienen problemas para el nado progresivo hiperactivado, no presentan la hiperpolarización para la capacitación de los espermatozoides y no pueden llevar a cabo la reacción acrosomal, por tanto son incapaces de fecundar al ovocito. Hasta la fecha no se ha podido caracterizar la posible participación del canal Slo3 en espermatozoides de humano (hSlo3). Por tal motivo, uno de los objetivos de este proyecto fue desarrollar herramientas moleculares que nos permitieran profundizar en el estudio del papel que podría desempeñar este canal durante la fecundación. Por otro lado tampoco se conocía la distribución subcelular del canal Slo3 en espermatozoides de ratón (mSlo3) ni de humano. Para responder a esta incógnita, se desarrolló un anticuerpo que nos permitió localizar al mSlo3 en espermatozoides de ratón. Como primer paso subclonamos a los genes que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 en el vector de expresión pCDNA 3.1 (-) lo que nos permitió expresarlos transitoriamente en células de ovario de hámster chino (células CHO) con la finalidad de establecer un modelo celular para el posterior estudio de sus propiedades biofísicas. Verificamos la expresión de los canales hSlo3 y mSlo3 en las células CHO por inmunocitoquímica y demostramos su funcionalidad con registros de su potencial de membrana en reposo ($E_{m_{rep}}$). La expresión de los canales Slo3 en las células CHO produjo un cambio en el $E_{m_{rep}}$, induciendo una hiperpolarización, cambio que se revirtió total o parcialmente cuando bloqueamos la actividad del canal hSlo3 con dos inhibidores de canales de K^+ (Ba^{2+} y TEA, respectivamente). Por último, con respecto a la localización subcelular del canal mSlo3 en espermatozoides de ratón, nuestros resultados indican que los canales Slo3 se localizan en la punta de la región acrosomal, en la pieza media y en la pieza principal del flagelo donde podrían participar modulando a la reacción acrosomal y a la movilidad del espermatozoide, como consecuencia de la compartimentalización subcelular del espermatozoide. En nuestro conocimiento, en este proyecto establecimos el primer modelo de expresión heteróloga del canal hSlo3 en una línea celular de mamífero. El desarrollo de las herramientas moleculares del presente trabajo nos permitirá, en un futuro, caracterizar las propiedades biofísicas del canal hSlo3 e indagar sobre el posible papel que desempeña en el espermatozoide.

2. Introducción.

2.1. Fecundación en mamíferos

En la actualidad, existen alrededor de 5000 especies de mamíferos en el mundo, los cuales difieren en morfología, fisiología y estrategias de reproducción. Todos llevan a cabo una reproducción sexual mediante la fecundación [1], proceso fundamental para favorecer la diversidad genética.

La fecundación es el proceso por el cual dos gametos haploides, el espermatozoide masculino y el ovocito femenino, se unen para producir a un individuo genéticamente distinto [2]. A pesar de que la fecundación se concibe con la unión de las dos células haploides y la recombinación genética de las células germinales, se requiere de una gran regulación molecular y fisiológica para que este proceso pueda ocurrir.

En mamíferos, el semen (constituido por los espermatozoides y el plasma seminal) es eyaculado dentro de la vagina o útero, y a partir de este sitio, los espermatozoides se mueven activamente y pasivamente (mediante nado y la ayuda de las contracciones musculares del tracto reproductor femenino, respectivamente) hasta llegar al istmo del oviducto, sitio donde se van almacenando [3]. Finalmente, los espermatozoides llegan al ampulla, sitio donde ocurre la fecundación (**Figura 1**).

El plasma seminal es de gran importancia para que ocurra la fecundación. Su principal función es ofrecerle al espermatozoide un ambiente favorable que le facilita llegar al ampulla. El plasma seminal es secretado por diferentes glándulas sexuales accesorias (principalmente por la vesícula seminal y la próstata) a lo largo del sistema reproductor masculino. Su concentración varía entre las especies. En general, el

plasma seminal se constituye por fosfatasas ácidas, ácido cítrico, inositol, calcio, zinc, magnesio, fructosa, ácido ascórbico, prostaglandinas, etc. [Revisado en 4 y 5].

El reconocimiento de los gametos debe ser especie específico, y entre los elementos cruciales para que ocurra esta restricción, se debe a una matriz extracelular del ovocito, llamada zona pelúcida (ZP) [6]. La ZP está constituida de glicoproteínas y aparentemente representa una barrera significativa para que no ocurra un cruce interespecífico. Esto se atribuye a la presencia de receptores para el espermatozoide en esta matriz extracelular ya que, en ensayos *in vitro*, al remover la ZP de los ovocitos, ocurre una unión directa entre el espermatozoide y la membrana plasmática de los ovocitos de diferentes especies [revisado en 5].

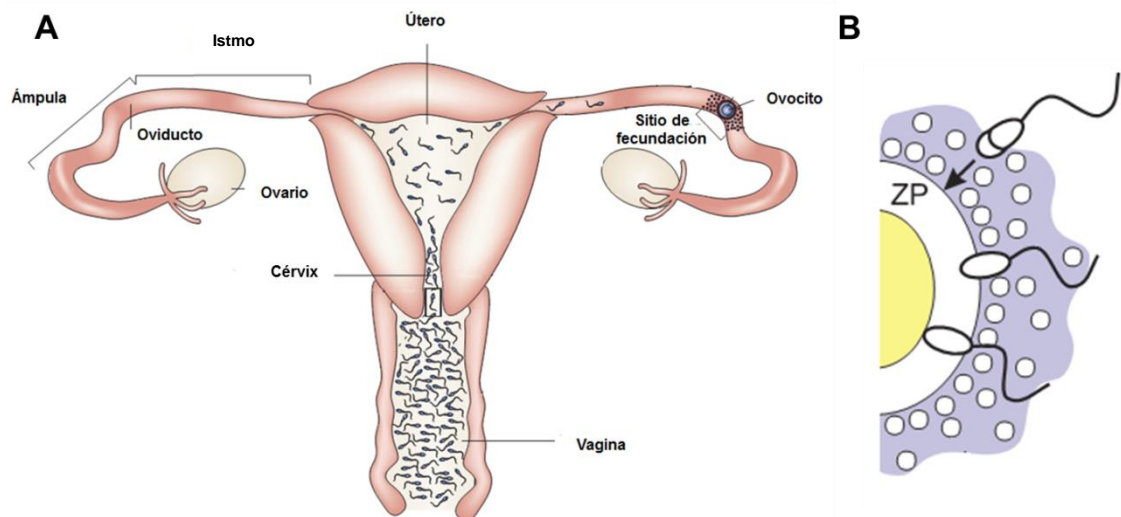


Figura 1: Fecundación en mamíferos

A, muestra al sistema reproductor femenino de humano, sitio donde ocurre la fecundación. Los gametos masculinos son eyaculados en la vagina y debido a su nado y contracciones musculares pueden emprender el viaje pasando por el cérvix y el útero. Finalmente llegan al oviducto, constituido por el istmo (sitio de almacenamiento de espermatozoides) y al ampulla (sitio donde ocurre la fecundación). Los ovarios son el lugar donde se producen y almacenan los ovocitos, los cuales migran al ampulla durante la ovulación. **B**, Acercamiento del sitio de fecundación (en A), se muestra la interacción del espermatozoide con el ovocito (en amarillo se representa el citoplasma del ovocito). Los espermatozoides deben atravesar la zona pelúcida (ZP), la cual es especie específica, para que ocurra la fecundación, recombinación de información genética y el desarrollo de un nuevo individuo. [Modificado de 3; 6]

Por otro lado, el espermatozoide presenta más identidades moleculares implicadas en el reconocimiento del ovocito para que ocurra la unión especie específica [9], además el espermatozoide es una célula terminal que debe madurar (espermatogénesis), responder a cascadas de señalización y cambios bioquímicos–fisiológicos producidos por diversas moléculas y segundos mensajeros que se va encontrando a los largo de su viaje hacia el ovocito, y la activación de canales iónicos para poder fecundarlo [6].

El presente trabajo aborda el estudio del canal de K^+ Slo3 de humano (hSlo3) y de ratón (mSlo3). Este canal se expresa exclusivamente en espermatozoides de mamíferos y su participación es crucial en el proceso de la fecundación.

2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis se refiere al desarrollo de un espermatozoide haploide maduro a partir de una célula germinal diploide, la espermatogonia, proceso que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos [6, 8]. Los túbulos seminíferos contienen las células germinales en sus diferentes fases de desarrollo; las células de Sertoli que rodean a las células germinales; y otros tipos celulares [revisado en 9]. La función de las células de Sertoli es mantener la espermatogénesis y proveer a las células germinales de soporte estructural y nutricional [10].

La espermatogénesis puede dividirse principalmente en tres fases. La primera fase consiste en la proliferación de las espermatogonias, las cuales dan lugar a los espermatocitos. La segunda fase se compone de espermatocitos primarios y secundarios los cuales por procesos meióticos dan lugar a células haploides, las espermátidas. La tercera fase se refiere a las transformaciones citoplasmáticas que dan lugar a la producción de espermatozoides [revisado en 10] donde también las

espermátidas desarrollan, entre otras cosas, la formación del acrosoma y la condensación de la cromatina (*espermiogénesis*), y la transcripción y traducción de proteínas [revisado en 7] (**Figura 2**).

Como se mencionará más adelante, el espermatozoide es una célula terminal diferenciada, es decir ya no lleva a cabo transcripción y traducción de proteínas. A pesar de su desarrollo durante la espermatogénesis, los espermatozoides son incapaces de nadar y fecundar al óvulo, por lo que una vez que abandonan el testículo, deben de madurar en el epidídimo, además de desarrollar movilidad hiperactivada, capacitación y la reacción acrosomal.

2.1. El espermatozoide

En 1677, el científico Van Leeuwenhoek fue el primero en descubrir al espermatozoide al cual denominó “animalacula” [revisado en 11]. Desde entonces han existido grandes avances en el estudio del espermatozoide, de su morfología y su fisiología.

El espermatozoide es una célula haploide terminal diferenciada. Con respecto a su morfología, se divide en dos regiones principales: la cabeza y el flagelo (**Figura 3**). La cabeza está compuesta por un núcleo condensado, el acrosoma y citoplasma. El flagelo está formado por tres regiones sucesivas: la pieza media, pieza principal y pieza terminal. El axonema es la estructura que compone al flagelo y consiste en nueve dobletes de microtúbulos que rodean a un doblete central; las dineínas y fibras que dan estructura y soporte a flagelo son otros componentes del axonema [revisado en 14]. La pieza media está enriquecida por mitocondrias las cuales son importantes para brindar la energía necesaria para el batido flagelar.

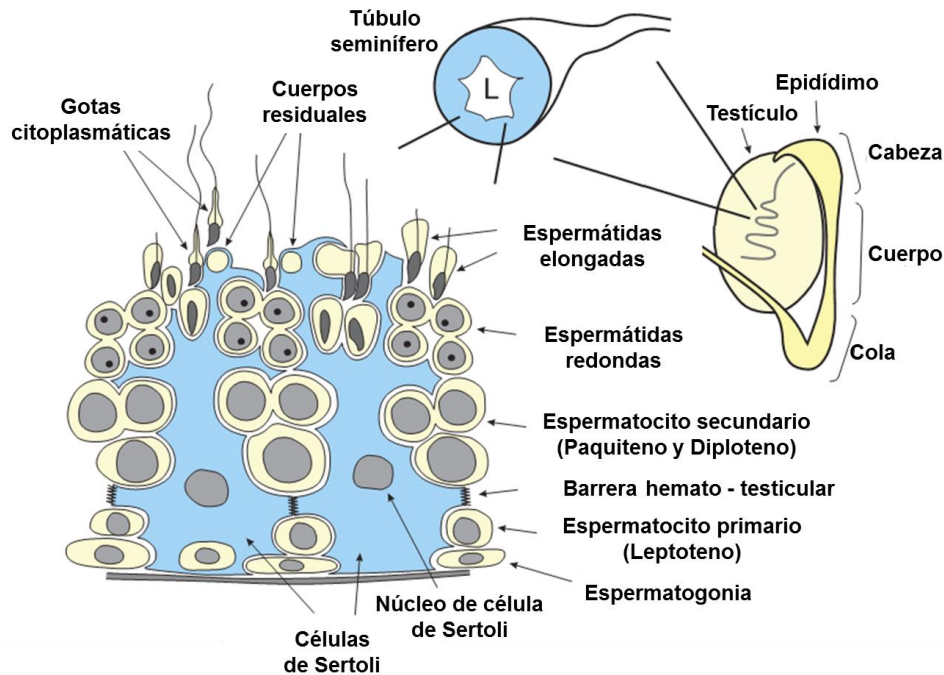


Figura 2: Espermatogénesis.

La espermatogénesis en mamíferos ocurre en los túbulos seminíferos (*esquema superior*) de los testículos (*panel derecho*). *Panel izquierdo*: diagrama de la espermatogénesis; las espermatogonias pertenecen a la línea celular germinal las cuales están en constante división en la parte basal del lumen de los túbulos seminíferos. Debido a que existe una barrera hematotesticular adyacente a las células de Sertoli (células que mantienen la espermatogénesis y dan soporte estructural y nutricional a las espermatogonias), las espermatogonias deben comenzar una primera división meiótica dando origen a los espermatocitos primarios, en la región basal del túbulo. Los espermatocitos primarios son las únicas células que pueden cruzar dicha barrera cuando alcanzan su fase de leptoteno. Los espermatocitos primarios continúan la primera división celular originando espermatocitos secundarios, los cuales por la segunda división meiótica forman espermatidas redondas. El último paso es la espermiogénesis, donde las células tienen cambios morfológicos, pierden gran parte del citoplasma (originando la gota citoplasmática y los cuerpos residuales), forman al acrosoma y ocurre la condensación de la cromatina. Procesos posteriores de maduración ocurren en el epidídimo (*panel derecho*), el cual se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola [Modificado de 6].

En 1995, Burgos y Fawcett confirmaron que el acrosoma se deriva a partir del aparato de Golgi [15]. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialuronidasa y muchas otras enzimas como hidrolasas y esterasas, las cuales son esenciales para la lisis de la zona pelúcida y la penetración del ovocito [Revisado en 11].

El núcleo contiene la información genética que se recombinará con la del ovocito para la formación del cigoto. La reorganización del material cromosomal durante la espermiogénesis está acompañada por el remplazo de histonas por protaminas, las cuales son las principales proteínas nucleares del espermatozoide maduro que compactan al material genético [Revisado en 11].

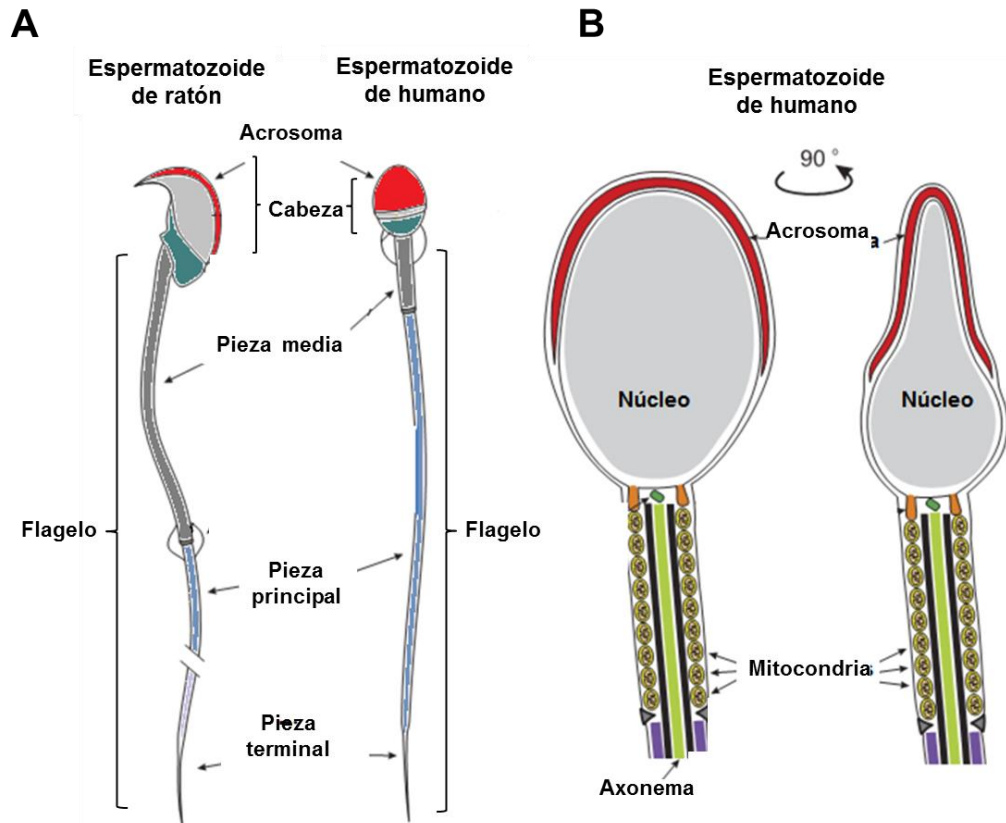


Figura 3: Morfología del espermatozoide de mamífero.

Esquemas de las principales estructuras que constituyen al espermatozoide de humano y de ratón. **A**, el espermatozoide está dividido principalmente en cabeza y flagelo. La cabeza a su vez se compone del acrosoma, el núcleo y la región postacrosomal. Por otra parte, el flagelo posee tres regiones definidas que son la pieza media, pieza principal y pieza terminal. **B**, Ampliación de la cabeza y la pieza media del espermatozoide de humano visto desde dos ángulos diferentes (90° de rotación) de un corte transversal. El núcleo ocupa la mayor parte del espacio de la cabeza y lo rodea el acrosoma; hay muy poco citoplasma en estas células. Las mitocondrias se localizan rodeando al axonema el cual constituye a todo el flagelo [Modificado de 6].

El flagelo tiene importancia motriz y tiene un papel crucial para que el espermatozoide se encuentre con el ovocito. Como se describirá más adelante, la

movilidad tiene que ser regulada de manera sofisticada para que el espermatozoide cumpla con su objetivo final, fecundar al ovocito.

2.2. Movilidad

Los espermatozoides que dejan los testículos y entran al epidídimo son gametos no funcionales (no pueden fecundar). Es sólo durante su tránsito en el epidídimo que los espermatozoides maduran y adquieren movilidad progresiva y la habilidad para llevar a cabo el proceso de la capacitación que ocurrirá en el tracto genital femenino (TGF) y que es requerida para que puedan fecundar al óvulo. Durante su estancia en el epidídimo, el espermatozoide tiene cambios morfológicos (como la remodelación del acrosoma y el núcleo), bioquímicos (reorganización de lípidos y proteínas, cambios en fosfolípidos y colesterol) y fisiológicos ocasionados por el ambiente del epidídimo (bajas concentraciones de Na^+ y Cl^- y altas concentraciones K^+ , además de un pH bajo, secreción de sustancias e interacción con proteínas) [14-17]. Estos cambios llevan al espermatozoide a la maduración, proceso que continúa en el TGF donde adquieren lo necesario para fecundar al ovocito.

2.3. Capacitación e hiperactivación en el tracto genital femenino (TGF)

Los espermatozoides eyaculados en el TGF todavía son incapaces de fecundar al ovocito, para lograr este objetivo los espermatozoides deben enfrentarse a nuevos ambientes presentes en el TGF y continuar su maduración.

Los espermatozoides eyaculados en el TGF muestran un batido flagelar lento y simétrico, con una curvatura baja y un patrón de nado progresivo con una direccionalidad casi recta (movilidad activada) [8] (**Figura 4**).

Estudios anteriores han demostrado que sólo un número restringido de espermatozoides eyaculados participan en la fecundación y que éstos muestran un cambio en la fluidez de la membrana plasmática (capacitación) y cambios en la movilidad (hiperactivación) y el oviducto provee al espermatozoide el ambiente favorable para que ocurran estos procesos [revisado en 18].

En 1970, Yanagimachi, reportó que el espermatozoide de hámster se comportaba extremadamente motil [revisado en 19], y describe que los espermatozoides que presentan esta característica se localizan en el ámpula del oviducto, proponiendo que este tipo de movilidad podría aumentar la capacidad de los espermatozoides para atravesar las células del *cummulus* (que rodean al ovocito), la zona pelúcida y fecundar al ovocito [20].

In vitro y en un medio de baja densidad, esta hiperactivación en la movilidad se caracteriza por un patrón de batido flagelar asimétrico con mayor amplitud y mayor curvatura [8] provocando que el espermatozoide nade en círculos; sin embargo en el TGF el espermatozoide se encuentra en un ambiente altamente viscoso. Suarez y Dai (1992), propusieron y demostraron que en un medio viscoso (enriquecido con metilcelulosa), el nado de los espermatozoides hiperactivados es un nado progresivo [21] (**Figura 4**).

El Ca^{2+} extracelular es uno de los segundos mensajeros más importantes para que ocurra la hiperactivación. Hace menos de una década se demostró que el influjo de Ca^{2+} relacionado con la hiperactivación está mediado por canales de Ca^{2+} de la familia CatSper, canales expresados exclusivamente en células espermátogénicas y localizados en la pieza principal del flagelo del espermatozoide maduro. Tal es la importancia de CatSper en la fisiología del espermatozoide, que los ratones nulos para este canal son infértiles, fenómeno relacionado a problemas de movilidad hiperactivada [19].

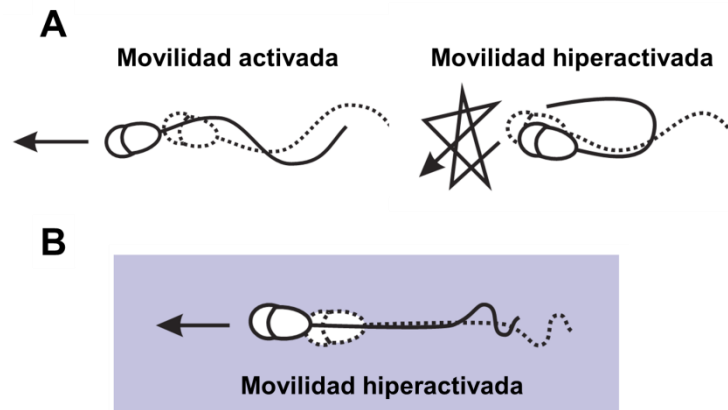


Figura 4: Movilidad del espermatozoide de mamífero.

A Direccionalidad del nado producido por el batido flagelar en espermatozoides con movilidad activada (*izquierda*) y movilidad hiperactivada (*derecha*) en medios de baja viscosidad. La movilidad activada favorece nados progresivos y un batido flagelar simétrico, mientras que los espermatozoides hiperactivados nadan en el mismo lugar debido a un patrón de batido flagelar asimétrico. **B**, la importancia de la hiperactividad radica en que en medios viscosos, como en el TGF, el nado de los espermatozoides hiperactivados se vuelve progresivo, avanzando mejor que los espermatozoides con sólo movilidad activada. [Modificado de 6].

Existen otras identidades moleculares que tienen un papel crucial en la movilidad. Una de ellas es el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE, por sus siglas en inglés), ya que como lo reportan Wang y colaboradores en el 2007, la pérdida de expresión de este intercambiador causa infertilidad debido a la falla en la movilidad [22, 23]. Por otro lado, como se mencionará más adelante, el canal de K^+ , Slo3, tiene un papel importante en la movilidad ya que, los ratones nulos en este canal tienen deficiencia en la movilidad progresiva, no presentan la hiperactivación y son infértiles [24].

A pesar de que la movilidad hiperactivada es fundamental para que el espermatozoide se encuentre con el ovocito, la capacitación es otro fenómeno importante y complejo que es crucial para que suceda la reacción acrosomal y por tanto la fecundación, proceso que se piensa está relacionado con la hiperactivación.

La capacitación se define como el fenómeno biológico que incluye modificaciones funcionales como cambios fisiológicos y bioquímicos que permiten al

espermatozoide adquirir la habilidad para poder fecundar al ovocito [revisado en 24], [26].

Entre los cambios que se asocian con la capacitación del espermatozoide están la remoción del colesterol de la membrana plasmática mediada por la albúmina [revisado en 6]. Esta remoción tiene como consecuencia un cambio en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide, lo cual tiene consecuencias en la reorganización de los lípidos y proteínas presentes en la membrana plasmática y prepara al espermatozoide para la futura potencial fusión de las membrana interna y externa del acrosoma [revisado en 25].

Por otro lado, en el TGF las concentraciones de HCO_3^- aumentan hasta cinco veces, comparado con la concentración de la cabeza del epidídimo [revisado en 6]. El flujo de este anión a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC por sus siglas en inglés) desencadena una cascada de señalización en el espermatozoide. Entre los principales efectos por influjo de HCO_3^- se encuentran el aumento de cAMP producido por la Adenilato Ciclasa soluble (sAC), la cual se activa por el bicarbonato directamente de manera dependiente de pH, alcanzando un máximo en 60 s. Este proceso induce un incremento en la fosforilación de proteínas, desencadenado por las proteínas cinasas A (PKA) activadas por cAMP [17, 25, 27] (**Figura 5**).

Las diferencias en las concentraciones iónicas en el TGF con respecto a las concentraciones observadas en el epidídimo, también desencadenan reacciones importantes en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i), pH intracelular (pH_i) y en el potencial de membrana del espermatozoide.

El aumento de Ca^{2+}_i se debe, en parte, al influjo de Ca^{2+} extracelular a través de CatSper. Sin embargo, este ion también puede aumentar en el citoplasma por la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas [28].

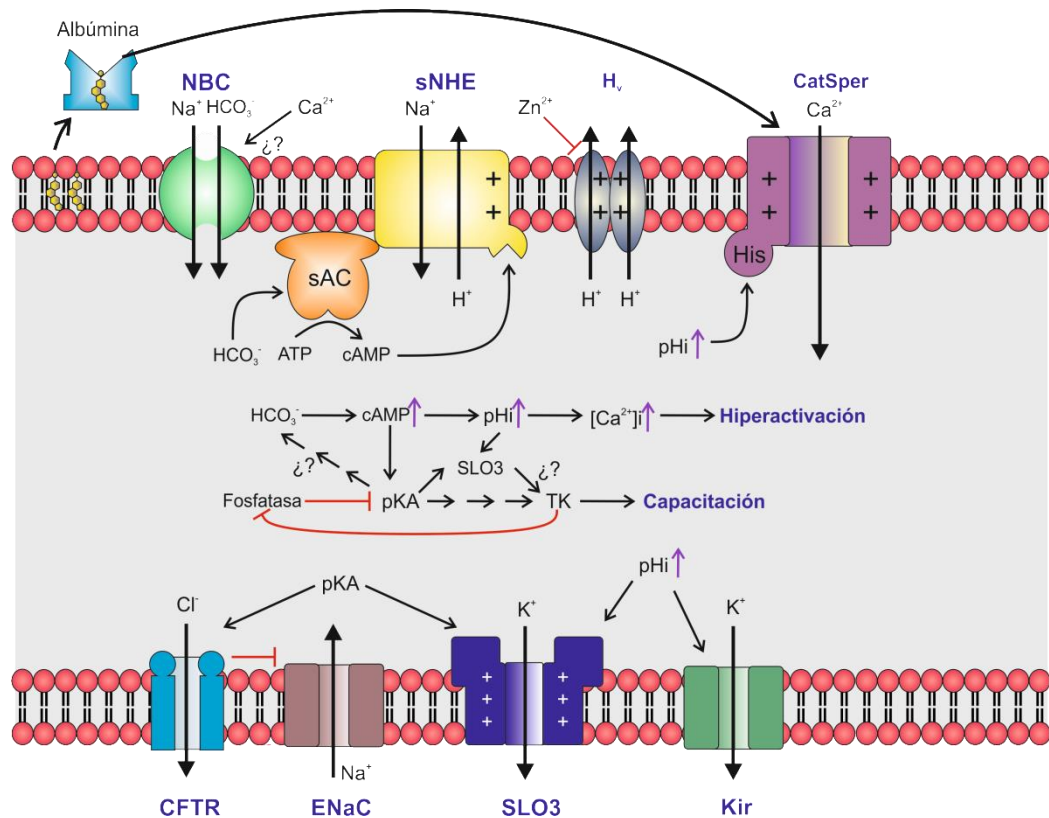


Figura 5: Flujos iónicos durante la movilidad hiperactivada y la capacitación.

Ambos procesos ocurren durante el viaje del espermatozoide en el TGF. La albúmina presente en el tracto femenino remueve el colesterol de la membrana plasmática modificando las propiedades de la membrana; además también puede activar directamente a los canales CatSper, incrementando el Ca²⁺_i. La activación de NBC (posiblemente activado por Ca²⁺ extracelular) incrementa los niveles de HCO₃⁻ activando a la sAC y produciendo un aumento de cAMP, el cual activa al sNHE. El sNHE y el canal de protones H_v podrían aumentar el pHi, factor que influye en la activación de los canales CatSper y Slo3. La activación de los canales CFTR, Slo3, Kir y la desactivación de los canales ENaC podrían estar participando en la hiperpolarización de la célula observada en algunas especies. Por otro lado el aumento de cAMP activa a las PKAs, las cuales estimulan la fosforilación de tirosinas [Modificado de 6].

El sNHE también participa en la capacitación, ya que junto con el canal de protones (H_v) inducen un aumento en el pHi (**Figura 5**).

El aumento de pHi es muy importante en la vía de señalización de la capacitación y de la movilidad hiperactivada. En el espermatozoide existen algunos canales que son activados por aumento del pHi, como el canal CatSper (responsable del influjo de Ca²⁺) y del canal Slo3, canal de K⁺ que como se verá más adelante, tiene un papel importante para que se lleve a cabo la fecundación.

Con respecto a los canales que podrían participar en la hiperpolarización del potencial de membrana de los espermatozoides capacitados de algunas especies, están los canales CFTR, ENaC, K_{ir} y Slo3. Los canales CFTR, son canales de Cl^- activados por la fosforilación por PKA, que participan en el cierre de los canales ENaCs, canales de Na^+ que contribuyen a la depolarización de la membrana del espermatozoide [revisado en 17],[29]. Por otra parte, los canales K_{ir} y Slo3 son canales de K^+ que al activarse permiten la salida de K^+ , contribuyendo así a la hiperpolarización (**Figura 5**).

2.4. Reacción Acrosomal

La capacitación y la adquisición de la movilidad hiperactivada del espermatozoide, obtenidas en el TGF, son procesos necesarios para que el gameto masculino pueda encontrar al ovocito, unirse a la zona pelúcida y llevar a cabo la reacción acrosomal.

Como se mencionó anteriormente, el acrosoma es una gran vesícula secretoria que se encuentra alrededor del núcleo del espermatozoide en la parte anterior de la cabeza. Su organogénesis sugiere que se deriva del complejo de Golgi durante la espermatogénesis. En el acrosoma se encuentran una gran variedad de proteínas que desempeñan diferentes funciones (reconocimiento, proteolíticas, de unión, etc.) para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito [revisado en 1].

La reacción acrosomal es un proceso exocitótico en el cual se libera el contenido del acrosoma, se modifican los componentes de la membrana y se expone la membrana acrosomal interna al medio extracelular. Este fenómeno se caracteriza por un aumento de Ca^{2+}_i [revisado en 6].

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para el estudio de la movilidad hiperactivada, la capacitación y la reacción acrosomal, no se conocen completamente estos procesos que son de vital importancia en la fisiología del espermatozoide. Sin embargo se sabe que existen algunas entidades moleculares que son indispensables para que ocurran estos procesos. Tal es el caso del canal de K^+ Slo3, que como se verá más adelante, es fundamental para que se lleven a cabo una movilidad adecuada, la hiperpolarización característica de la capacitación y, como consecuencia, la reacción acrosomal.

2.5. Generalidades de los canales de K^+

El espermatozoide a lo largo de su trayecto en su viaje hacia el ovocito, se encuentra con diferentes ambientes los cuales exhiben concentraciones iónicas distintas. Esto trae como consecuencia que las concentraciones iónicas intracelulares del espermatozoide también cambien como resultado de la permeabilidad iónica de su membrana plasmática. Este cambio ocurre como consecuencia de la presencia de canales y transportadores presentes en la célula, los cuales determinan al potencial eléctrico del gameto, conocido como potencial de membrana en reposo ($E_{m_{rep}}$). Antes de la capacitación, el espermatozoide de ratón se encuentra depolarizado con un $E_{m_{rep}}$ de -35 a -45 mV. Este $E_{m_{rep}}$ se hiperpolariza (-70 mV) durante la capacitación. El potencial registrado en la hiperpolarización se acerca al potencial de equilibrio de K^+ (-90 mv) [revisado en 17] sugiriendo que los canales de K^+ son de gran importancia en la fisiología del espermatozoide.

Los canales de K^+ se han estudiado desde los años 50's cuando Hodgking y Huxley demostraron que la membrana celular puede distinguir y controlar el flujo de Na^+ y K^+ [revisado en 30]. Se considera que los canales de K^+ son el grupo más

grande y diverso de los canales iónicos; la apertura de estos canales permite el flujo de iones de K^+ , provocando un $E_{m_{rep}}$ más negativo [revisado en 31].

Los canales de K^+ tienen una amplia distribución en los organismos, encontrándose en bacterias, hongos, plantas y animales; y tanto es su importancia que se han realizado estudios cristalográficos y electrofisiológicos de estos canales para intentar entender cómo funcionan ya que los canales de K^+ son tan esenciales que disfunciones en éstas proteínas causan un gran número de enfermedades [revisado en 31], [32].

A pesar de que existen muchas dificultades para estudiar los canales de membrana, dado que son proteínas con segmentos hidrofóbicos, existen grandes avances acerca de su funcionalidad y su selectividad iónica.

Los canales de K^+ pueden ser clasificados por la forma en que éstos se modulan, algunos se abren en respuesta al cambio de voltaje en la membrana, cambios en las concentraciones de Ca^{2+} , pH, y otros más son regulados por proteínas G [revisado en 33]. Sin embargo los canales de K^+ conservan una secuencia de aminoácidos en el asa del poro de selectividad que se encuentra en casi todos los canales de K^+ conocidos, la secuencia firma de los canales de potasio: TTVGYGD (donde sólo las Glicinas son estrictamente conservadas) [revisado en 30] (**Figura 6**). Esta secuencia tiene gran influencia en la selectividad de los canales ya que al realizar sustituciones de residuos de aminoácidos en la secuencia firma, la selectividad de los canales se ve alterada [33] Como se verá más adelante, el canal Slo3 difiere en la secuencia firma de otros canales de K^+ y su selectividad a este ión se ve reducida.

La estructura de los canales de K^+ es diversa. En este trabajo sólo se describirá la estructura de los canales de K^+ Slo.

2.6. Canales de K⁺ de la familia Slo

Los canales de K⁺ de la familia Slo se caracterizan por tener conductancias unitarias altas, es decir, la corriente que pasa por un solo canal es alta en comparación con otros canales de K⁺ (~250 pS). Otros nombres con lo que se puede denominar a los canales de la familia Slo son: canales “grandes” de potasio (BK, por sus siglas en inglés) o canales maxi-K [34].

En la actualidad se sabe de cuatro genes que codifican para los canales de K⁺ en la familia Slo: *Slo1*, *Slo2.1*, *Slo2.2* y *Slo3*. Estos genes codifican para subunidades α , las cuales forman un tetrámero que constituye a los canales de K⁺ Slo funcionales. A pesar de que estos canales de K⁺ de conductancia unitaria alta pertenecen a la misma familia, la forma en cómo se regulan, su distribución y su estructura varían (Figura 6).

2.6.1. Canales Slo1

Dentro de los canales de K⁺ dependientes de voltaje, los canales Slo1 son de gran importancia ya que juegan un papel fundamental para regular la excitabilidad neuronal y muscular vía la señalización por Ca²⁺ intracelular. Además se encuentran en diferentes tejidos y células incluyendo neuronas, músculos de los vasos sanguíneos, células cromafinas, etc. donde controlan la liberación de neurotransmisores y participan en la repolarización de las células después de un potencial de acción [revisado en 35 y 36].

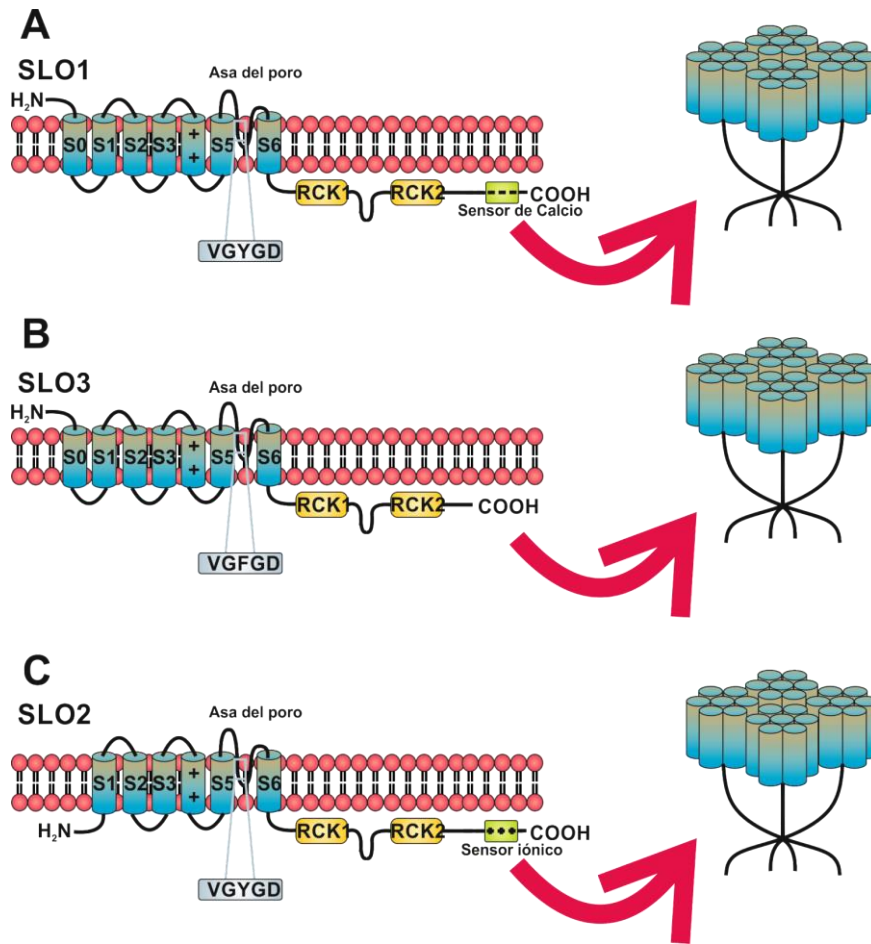


Figura 6: Canales de Potasio de la familia Slo.

Estructura de las subunidades α de los canales Slo. Las subunidades α de los canales Slo1 (**A**) y Slo3 (**B**) están constituidos por siete segmentos transmembranales; a diferencia de los canales Slo2 (**C**), los canales Slo1 y Slo3 tienen un segmento adicional, el S0. El canal Slo3 difiere de los canales Slo1 y Slo2 en la firma de canales de potasio; los canales Slo3 presentan una Fenilalanina (F) que sustituye a la Tirosina (Y) presente en los otros canales Slo. Por tal motivo, los canales Slo3 son menos selectivos para K^+ sobre Na^+ en comparación de los canales Slo1 y Slo2. Los canales Slo se caracterizan por estar conformados por un gran segmento en el carboxilo terminal el cual contiene a los dominios citosólicos de regulación denominados RCK1 y RCK2 (dominios de regulación de K^+ 1 y 2, respectivamente), o al sensor de Ca^{2+} en el Slo1 (**A**). El dominio que monitorea al Ca^{2+} está ausente en el Slo3 (**B**) y modificado en el Slo2 (**C**), donde las cargas positivas fueron reemplazadas por cargas negativas. El Slo2 también se distingue porque contiene un amino terminal intracelular y la ausencia de cargas positivas en el S4. Nótese que cuatro subunidades α se unen para formar un tetramero y constituir al canal funcional [modificado de 34].

Los canales Slo1 son canales de K^+ activados por voltaje en respuesta a un incremento de Ca^{2+}_i . Como se observa en la **figura 6A**, los canales Slo1 están constituidos por cuatro subunidades α . Cada subunidad α se forma por siete segmentos transmembranales; el cuarto segmento (S4) contiene aminoácidos

cargados positivamente, por lo que los canales Slo1 se agrupan en una superfamilia denominada S4. Este segmento es importante para la regulación por voltaje del canal. A diferencia de otros canales de esta superfamilia, los canales Slo1 tienen un segmento transmembranal S0 y un extremo amino extracelular. El extremo carboxilo es intracelular y comprende dos terceras partes de la proteína, además en este extremo se encuentran dos dominios reguladores de la conductancia de K^+ (RCK1 y RCK2 por sus siglas en inglés), dominios importantes para que el canal pueda activarse por un incremento Ca^{2+}_i , [35–38].

Al igual que los otros dos miembros de la familia Slo, el Slo1 tiene el asa del poro entre los segmentos S5 y S6, región donde se encuentra el filtro de selectividad de los canales de K^+ .

2.6.2. Canales Slo2

Hasta el momento se han identificado dos genes que codifican para los canales Slo2, denominados *slo2.1* y *slo2.2*. Los canales de K^+ Slo2 se forman por cuatro subunidades α como el Slo1 y el Slo3 pero a diferencia de los canales Slo1, los canales Slo2 se activan por Na^+ . Sin embargo se ha demostrado que en presencia de Cl^- , el modo de acción de ambos iones se vuelve sinérgico. Una cosa interesante de los canales Slo2 es que, mientras que en mamíferos este sinergismo ocurre entre Na^+ y Cl^- , estudios en *Caenorhabditis elegans* sugieren que el sinergismo ocurre entre Ca^{2+} y Cl^- [34, 39, 40].

Otra diferencia interesante es que los canales Slo2, a diferencia de los canales Slo1 y Slo3, no tienen el segmento transmembranal 0 (S0), conservando la estructura convencional de los canales de K^+ activados por voltaje de seis segmentos (S1-S6) con un dominio amino y carboxilo terminal citosólicos. De forma interesante, los

canales Slo2 tampoco presentan un S4 que contenga aminoácidos cargados positivamente [32, 37–39] (**Figura 6C**).

Con respecto a su distribución, los canales Slo2 en *C. elegans* se encuentran en neuronas y músculos [39], mientras que en mamífero hay reportes de la expresión diferencial del Slo2.2 y Slo2.1; el primero se expresa en cerebro, riñón y testículo, mientras que el segundo además de los tejidos mencionados se expresa en corazón, músculo, pulmón e hígado [40].

2.6.3. Canales Slo3

Los canales de K^+ Slo3 al igual que los canales Slo1 y Slo2 están constituidos por cuatro subunidades α que forman un tetrámero; cada subunidad α está conformada por siete segmentos transmembranales que van del S0 al S6 presentando un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citosólico. Con respecto a su selectividad, el canal Slo3 es menos selectivo a K^+ sobre Na^+ . Esta reducción se debe a que los canales Slo3, a diferencia de los canales Slo1 y Slo2, tienen una Fenilalanina (F) en la secuencia firma de los canales de K^+ en lugar de una Tirosina (Y). Como se verá más adelante, otra característica que diferencia a los canales Slo3 de los canales Slo1 y Slo2, es que estos canales además de responder al cambio en el voltaje de la célula, también responden a cambios en el pH_i y se expresan exclusivamente en el testículo.

3. Antecedentes

3.1. Función del canal Slo3 en la fecundación del ratón

Basados en la homología que tiene el canal de K^+ Slo3 con el canal de K^+ activado por Ca^{2+} o Slo1, en 1997, Schreiber y colaboradores, clonaron por primera vez al canal Slo3 de ratón (mSlo3) a partir de una biblioteca de cDNA testicular de ratón. Ellos demostraron que el canal de K^+ Slo3 se encontraba altamente expresado en espermatoцитos de mamífero y que representaba a un nuevo y único tipo de canales de K^+ regulado por pH_i y voltaje (activado por depolarización) que podría estar involucrado en la capacitación y en la reacción acrosomal. Además por rtPCR y ensayos de Northern Blot demostraron que se expresa únicamente en testículo, tanto en humano como en ratón [42].

Dado que el mSlo3 tiene un porcentaje de identidad alto con su homólogo mSlo1 (56 % de identidad en la región transmembranal y 39 % de identidad con la región citosólica [42]), en 2004, Xia y colaboradores, realizaron y expresaron quimeras en ovocitos de *Xenopus laevis* de los canales Slo1 y Slo3: las quimeras 1P3C y 3P1C. La quimera 1P3C estaba constituida por los segmentos transmembranales del canal Slo1 y la región citosólica del canal Slo3, mientras que la quimera 3P1C tenía los segmentos transmembranales del canal Slo3 pero el dominio citosólico del canal Slo1. En estos experimentos ellos demostraron que tanto el canal Slo3 silvestre como la quimera 1P3C tenían una dependencia a pH por lo que concluyeron que el dominio citosólico confería la sensibilidad al pH (la quimera 3P1C no se regulaba por pH) [37].

Años después Navarro y colaboradores, describieron en espermatozoides maduros de ratón, el efecto que tenía el pH_i en el potencial de membrana [43]. Ellos observaron que cuando ocurría una alcalinización intracelular, ésta producía una

hiperpolarización rápida en los espermatozoides de epidídimo de ratón y que la hiperpolarización se debía principalmente a corrientes de K^+ sensibles a pH_i originadas de la pieza principal del flagelo del espermatozoide, corrientes que ellos denominaron $I_{K_{Sper}}$. Además, dado que $I_{K_{Sper}}$ es también sensible a voltaje así como las corrientes de mSlo3 reportadas previamente en expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*, consideraron que las corrientes que ellos reportaron pudieran ser producidas por mSlo3. Sin embargo faltaban evidencias para poder confirmar esta hipótesis.

En el 2009, Martínez–López y colaboradores, considerando el último reporte de Navarro [43], correlacionaron las propiedades de las corrientes registradas de mSlo3 en ovocitos de *X. laevis* con las corrientes de K^+ nativas de espermatozoides testiculares [44]. La correlación se basó en dependencia de pH_i , de la activación de la corriente, el bloqueo por tetraetilamonio (TEA) (60mM) y Ba^{2+} (1mM) y la activación por cAMP tanto de las corrientes nativas de K^+ en espermatozoides testiculares como las del canal mSlo3 expresado en ovocitos de *X. laevis*.

Tanto en el reporte de Navarro (2007) como en el de Martínez–López (2009) la conclusión fue similar: las corrientes nativas de K^+ sensibles a pH_i y a voltaje de los espermatozoides de ratón pudieran ser por canales Slo3. Sin embargo sólo la estrategia experimental con el ratón nulo de este gen podría dar información más clara. De manera muy interesante, en 2010, Santi y colaboradores, demostraron que el mSlo3 juega un papel fundamental para la fecundación al realizar experimentos con el ratón nulo de mSlo3 (Slo3 -/-) [24].

La primera observación de Santi y colaboradores (2010) fue que los machos Slo3 -/- eran infértiles y que en condiciones de capacitación sus espermatozoides presentaban una morfología denominada “horquilla” en la cual los espermatozoides se caracterizan porque la pieza principal del flagelo se dobla 180° sobre sí mismo. Además de los cambios morfológicos, los espermatozoides de los ratones nulos para

el canal mSlo3 fueron incapaces de llevar a cabo la hiperpolarización de su potencial de reposo durante la capacitación a diferencia de los espermatozoides del ratón silvestre. Por otro lado, Santi y colaboradores demostraron que los espermatozoides testiculares del ratón Slo3 $-/-$ carecía de las corrientes de K^+ que se activaban con pulsos alcalinizantes de NH_4Cl y presentaban defectos en el nado progresivo, probablemente debido a la depolarización anormal después de la capacitación. Por último ellos observaron que los espermatozoides del ratón nulo no llevaban a cabo la reacción acrosomal y eran incapaces de fecundar en ensayos *in vitro*, aun cuando se removía la ZP de los ovocitos [24]. Con estas evidencias se pudo demostrar que, efectivamente, la corriente endógena $I_{K_{sper}}$ es mediada por el canal Slo3.

Debido a su importancia en los procesos de capacitación, reacción acrosomal y, en general, en la fecundación, se considera al canal Slo3 como un blanco farmacológico atractivo de un anticonceptivo.

Hasta el momento, los estudios reportados sobre el papel del canal Slo3 en la reproducción en mamíferos se han realizado en espermatozoides de ratón y con el mSlo3. Sin embargo, no hay reportes acerca del canal Slo3 de humano (hSlo3) y nada se sabe sobre sus propiedades biofísicas y su papel fisiológico en la reproducción a pesar de que se ha descrito su secuencia en el genoma humano. Sabiendo que el Slo3 se expresa específicamente en el testículo de humano (Schreiber y colaboradores., 1997), Santi y colaboradores lograron clonar al gen que codifica para el canal hSlo3 (datos no publicados) lo que abre la posibilidad de caracterizar las propiedades de este canal y profundizar en su posible papel fisiológico.

4. Justificación

Hasta la fecha no se han podido caracterizar ni las propiedades biofísicas ni la posible participación del canal Slo3 en espermatozoides de humano (hSlo3) debido a las características morfológicas propias de este gameto en la especie. Como una estrategia alternativa para el estudio de este canal, es necesario desarrollar herramientas moleculares que permitan profundizar en la caracterización del papel que desempeña este canal en la fecundación humana. Por esta razón en el presente proyecto establecimos las condiciones experimentales para la expresión heteróloga del canal hSlo3, subclonándolo en un vector de expresión para células de mamífero. Por otro lado, tampoco se conocía la distribución subcelular del canal Slo3 en espermatozoides de ratón ni de humano, por lo que fue importante desarrollar un anticuerpo capaz de reconocer al canal Slo3 de forma específica en ambas especies y determinar su distribución subcelular.

5. Hipótesis

El uso de técnicas de biología molecular, cultivo celular y espectrofluorimetría nos permitirán desarrollar estrategias alternativas útiles para el estudio de la fisiología del canal de K^+ Slo3 que se expresa exclusivamente en espermatozoide de mamífero.

La expresión del canal Slo3 en un sistema heterólogo que presenta una expresión casi nula de canales de K^+ endógenos producirá un cambio en el potencial de reposo de las células hacia valores más cercanos al potencial de equilibrio del K^+ , lo que constituirá una evidencia experimental de la funcionalidad del canal iónico objeto de este estudio.

6. Objetivos

6.1. Objetivos Generales

- Obtener un sistema de expresión heterólogo que permita el estudio de la fisiología de los canales hSlo3 y mSlo3.
- Determinar la distribución subcelular del canal Slo3 por medio de inmunocitoquímicas.
-

6.2. Objetivos particulares

- Verificar la identidad y la integridad molecular de las clonas que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 obtenidos mediante técnicas de biología molecular.
- Subclonar a los genes de los canales hSlo3 y mSlo3 en un vector de expresión para células de mamífero.
- Generar un anticuerpo policlonal que reconozca específicamente a los canales hSlo3 y mSlo3.
- Hacer transfecciones transitorias de los canales hSlo3 y mSlo3 en la línea celular de epitelio de ovario de Hamster chino (CHO).
- Identificar por inmunolocalización el patrón de expresión celular de los canales hSlo3 y mSlo3, en los espermatozoides correspondientes a la especie y en las células CHO transfectadas con los vectores para estos canales.
- Establecer la expresión funcional del canal en la línea celular mediante cambios en el $E_{m_{rep}}$ con respecto a las células no transfectadas.

7. Materiales y métodos

7.1. Obtención de las construcciones hSlo3-pOx y mSlo3-pOX

Los plásmidos correspondientes a las clonas de los genes de los canales Slo3 de humano (hSlo3) y de ratón (mSlo3) fueron donados por la Dra. Celia Santi, investigadora de la Escuela de Medicina en la Universidad de Washington, St. Louis, Missouri, USA. Los genes estaban insertados en el vector pOX, vector de expresión en ovocitos de *X. laevis*, por lo que fue necesario subclonarlos a un vector de expresión para células de mamífero como se verá más adelante.

7.2. Análisis de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por patrones de digestión y secuenciación.

7.2.1. Verificación de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por patrones de digestión

Se seleccionaron sitios de restricción que nos permitieron determinar por patrones de digestión la identidad molecular de las clonas. En la **Tabla 1** se muestran las enzimas seleccionadas, las reacciones de digestión que se llevaron a cabo para cada una de las clonas, y el número y tamaño de fragmentos que se esperaban observar. Para cada una de las reacciones se digirieron 500 ng de ADN, se utilizó la solución Tango para llevar a cabo la reacción y se utilizaron 0.5 unidades de cada una de las enzima. El volumen se ajustó con H₂O MiliQ al volumen final deseado. Las reacciones se incubaron por una hora a 37° C.

Tabla 1. Enzimas de restricción para análisis de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por patrones de digestión. En la tabla se muestran las enzimas de restricción (E.R) utilizadas para el análisis de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX: Se muestra el número de fragmentos y el tamaño en pares de bases (pb) de las bandas esperadas tras la digestión.

hSlo3		mSlo3	
E. R	No. de fragmentos y tamaños esperados	E. R	No. de fragmentos y tamaños esperados
NheI	Un fragmento de 6615 pb	SpeI	Un fragmento de 6525 pb
SpeI	Un fragmento de 6615 pb	XhoI	Un fragmento de 6525 pb
NaeI	Un fragmento de 4474 pb y un fragmento de 2141 pb	HindIII	Un fragmento de 5749 y un fragmento de 775pb
NheI + SpeI	Un fragmento de 3454 pb y un fragmento de 3161 pb	SacI	Un fragmento de 3527pb, un fragmento de 2656 pb y un fragmento de 341 pb
NheI + SpeI + NaeI	Un fragmento de 2595 pb, un fragmento de 1879 pb, un fragmento de 1575 pb y un fragmento de 566 pb.	SpeI+XhoI	Un fragmento de 3369 pb y un fragmento de 3155 pb

7.2.2. Verificación de las construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX por secuenciación

A partir de las secuencias reportadas en GeneBank para los canales Slo3, se diseñaron y se sintetizaron oligonucleótidos específicos para cada gen para verificar su identidad molecular. Los oligos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis Química de Oligonucleótidos, del Instituto de Biotecnología, UNAM.

En la **Tabla 2 y 3** se muestra la longitud de los oligonucleótidos la cual está dada en pares de bases (p.b.). También se muestra el contenido en porcentaje de Citosinas y Guaninas (%CG), la Tm de cada uno de los oligonucleótidos, en °C, y el tamaño de los segmentos de ADN secuenciado esperado por oligonucleótido. Los oligos 1, 2, 3, ,4 y T3 se diseñaron para secuenciar en el sentido 5', los oligos A, B, C, D y T7 se diseñaron para secuenciar en el sentido 3'.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la construcción hSlo3-pOX. Se muestra el nombre, la longitud en pares de bases (p.b.) y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las construcciones hSlo3-pOX. Además se muestra la Tm en grados centígrados (°C) y el porcentaje de Citosinas y Guaninas (%CG).

OLIGOS hSlo3				
NOMBRE	LONGITUD (p.b.)	SECUENCIA	Tm (°C)	%CG
Oligo1 hSlo3	27	CCA ACC TTT ATT TCT TAT TAT TTG AAG	61.68	25.93
Oligo2 hSlo3	21	TAG CCA ATC CTT TGT GCA GTG	64.88	47.62
Oligo3 hSlo3	21	TAT ATC AGG GCA GGA TTC TCC	64.88	47.62
Oligo4 hSlo3	18	GAA GGG TCC CTC CAA GAA	64.44	55.55
OligoA hSlo3	24	GTT GTC TGT GAT GCT TTA TTT ACA	62.37	33.33
OligoB hSlo3	18	GAC AGC ACA CAT GGA GCA	64.44	55.55
OligoC hSlo3	18	GGC TCT TCT GAC GTC CTT	64.44	55.55
OligoD hSlo3	25	AAA ACA ATT TCA GTG TTG ATC TCT C	62.58	32

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la construcción mSlo3-pOX. Se muestra el nombre, la longitud en pares de bases (p.b.) y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las construcciones mSlo3-pOX. Además se muestra la Tm en grados centígrados (°C) y el porcentaje de Citosinas y Guaninas (%CG).

OLIGOS mSlo3				
NOMBRE	LONGITUD (p.b.)	SECUENCIA	Tm (°C)	%CG
Oligo1 mSlo3	24	TTA CAG ATC CTA CAA GTC ATC AAG	63.79	37.5
Oligo2 mSlo3	21	CCA GAG TCA TCA TTC AGA TAC	63.26	42.86
Oligo3 mSlo3	21	AAC GAC AAA CGA CAC AGT GGA	64.88	47.62
Oligo4 mSlo3	21	TTC TTG GAT TCT CTC CTG GCC	66.5	52.38
OligoA mSlo3	21	CGC GTC CTC CCA GAC TTG ATT GCC	72.29	62.5
OligoB mSlo3	21	TCT GCA CCA GTG AAA CAT GCC	66.5	52.38
OligoC mSlo3	21	TCC CAG TTG GGG ATT TTT GAC	64.88	47.62
OligoD mSlo3	24	GGT GAA GAA AAC AAT GAA AAT CCG	63.79	37.5

7.3. Purificación de ADN a partir de gel de Agarosa

Este procedimiento se realizó para todas las purificaciones de ADN a partir de gel de agarosa. En un tubo eppendorf se colocó el fragmento de gel de agarosa que contenía el ADN de interés. Se le agregó la solución QG (Qiagen) tres veces en volumen con respecto al peso en gramos del fragmento de gel de agarosa. Se metió el tubo en un baño maría a 60° C hasta que se disolvió el gel en la solución QG. Se le

agregaron 10 μL de Buffer P3 (Qiagen) y un volumen de isopropanol con respecto al peso en gramos del fragmento de gel de agarosa. Se resuspendió y se pasó a una columna para purificación de ADN (Fermentas) con un volumen máximo de 800 μL . Se centrifugó un minuto. Se agregaron 500 μL de solución de lavado (Wash Solution, Fermentas) y se incubó por 2 min. Se centrifugó 1 min. Posteriormente se agregaron 50 μL de Agua miliQ y se incubó por 2 min. Por último, para obtener el ADN de la columna se centrifugó durante 2.5 min. En todos los casos la centrifugación se realizó a 11,000 revoluciones por minuto (rpm) en una Centrífuga Eppendorf 5424.

7.4. Extracción de ADN plasmídico con Miniprep.

Para extraer el ADN se utilizó el estuche de reactivos (“kit”) GeneJET™ Plasmid Miniprep. Las células de *E. coli* se cultivaron en 3 mL de medio Luria Bertani (LB) con Ampicilina (SIGMA, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante toda la noche a 200 rpm en tubos de ensaye. Transcurrido el tiempo, todo el volumen de cultivo se centrifugó en tubos eppendorf de 1.5 mL a 5,000 rpm durante 5 minutos conservando la pastilla y desechando el sobrenadante. A la pastilla se le agregaron 250 μL de solución de resuspensión y se agitó con vortex; 250 μL de solución de lisis y se invirtió el tubo cinco veces cuidadosamente; y 350 μL de solución de neutralización invirtiendo el tubo cinco veces cuidadosamente. Se centrifugó durante cinco minutos (a partir de este paso, las centrifugaciones realizadas fueron a 11,000 rpm a temperatura ambiente). El sobrenadante se transfirió a una columna GeneJET™, se cargó todo el volumen obtenido y se centrifugó 1 min. Se desechó el filtrado, se agregaron 500 μL de solución de lavado a la columna y se centrifugó por 1 min, se desechó el filtrado, y este paso se repitió una vez más. Se centrifugó la columna vacía durante 1 min para eliminar todo el exceso de solución de lavado. Se transfirió la columna a un nuevo tubo y se le agregaron 50 μL de agua MQ incubando durante 2 min. Se centrifugó durante 2 min para eluir el ADN. Posteriormente, se cuantificó la muestra. Todas las centrifugaciones se realizaron en un Centrífuga Eppendorf 5424.

7.5. Cuantificación de Ácidos Nucleicos.

La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm). Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo con 1 μ L de cada muestra. Antes de las mediciones de ácidos nucleicos, se realizaba una lectura con el líquido en el que se disolvían las muestras (vehículo), esto con el fin de obtener el blanco de la lectura.

7.6. Preparación de células quimiocompetentes DH5 α

Para preparar a las bacterias que utilizamos para la amplificación de nuestras construcciones, se inocularon 50 mL de medio LB con una sola colonia de células de *E. coli* DH5 α y se dejaron crecer toda la noche a 37° C con agitación a 250 rpm. Del cultivo anterior se inocularon 4 mL en 400 mL de medio LB en un matraz estéril de 2 L y se dejaron crecer a 37° C en agitación a 250 rpm aproximadamente 2 h.

Este último cultivo se alicuotó en 8 tubos Falcon (BD) de 50 mL pre-congelados y se dejaron reposar en hielo durante 10 min.

Posteriormente las células se centrifugaron durante 7 min a 1600 x g a 4° C y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió suavemente en 10 mL de una solución de CaCl₂ (60 mM) previamente enfriada en hielo. Después se realizaron dos centrifugaciones consecutivas de 5 min de duración a 1100 x g, a 4° C, siempre descartando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 10 mL de la solución de CaCl₂ (60 mM) enfriada en hielo. Por último, las células se alicuotaron y se almacenaron -70° C hasta su uso.

7.7. Transformación de E. coli quimiocompetentes DH5 α

Las transformaciones con cada construcción se realizaron en la cepa DH5 α preparada en la sección anterior. En un cultivo de 100 μ L de células quimiocompetentes se agregaban ~100 ng del ADN que se deseaba amplificar. El cultivo se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente se aplicó un choque térmico a 42° C durante 2 min. Una vez transcurrido ese tiempo, el cultivo se regresó nuevamente al hielo por 5 min. Por último se dejó en 0.5 mL de medio LB sin antibiótico durante 1 h a 200 rpm, con el fin de dar el tiempo a las células de recuperarse. Transcurrido el tiempo, se propagaron 200 μ L en una caja de Petri con medio LB sólido con ampicilina (SIGMA, 50 μ g/mL) y se incubaron durante toda la noche a 37° C. A partir de las colonias resistentes al antibiótico de selección se realizaban nuevos cultivos para incrementar el número de células transformadas con las construcciones de interés y recuperar los plásmidos correspondientes.

7.8. Electroforesis de ADN

Las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 1 %. La agarosa se disolvió en una solución TAE calentándola en horno de microondas por aproximadamente 40 segundos. Una vez polimerizada la agarosa del paso anterior, se corrieron las muestras de ADN previamente mezcladas con "Loading Buffer" (en una cámara de electroforesis que contenía solución TAE. El voltaje aplicado en la electroforesis fue de 80 mV durante el tiempo deseado. Posteriormente el gel se tiñó con SYBR[®] Gold de Invitrogen 10X disuelto en solución TAE en agitación constante. Las fotografías de los geles se tomaron con la incidencia de luz UV proveniente de un transiluminador T1201 SYGMA[™] y una cámara Kodak la cual tenía acoplado un filtro de emisión (placa de acrílico naranja que funciona como filtro "long pass"; la placa permite observar la emisión de Syber[®] Gold, Invitrogen, >500 nm).

7.9. Secuenciación de ADN

Todas las muestras de ADN del presente trabajo se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las mezclas ADN/Oligo se entregaron en un volumen final de 16 μL en agua grado biología molecular. Para secuenciar a partir de producto de PCR se requerían 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN; para secuenciar ADN plasmídico obtenido a partir de extracción por Miniprep, se requerían 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

7.10. Subclonación de los genes que codifican para los canales de K^+ hSlo3 y mSlo3 en el vector de expresión pCDNA3.1 (-)

La subclonación consistió en cambiar de vector de expresión a las clonas que codifican para los canales de K^+ hSlo3 y mSlo3, del vector pOX para ovocitos al vector pcDNA 3.1 (-) para expresión en células de mamífero. Con este fin, fue necesario introducir nuevos sitios de restricción en los extremos de los genes que codifican para los canales de K^+ y este procedimiento se describe a continuación.

7.10.1. Inserción del sitio HindIII al gen que codifica para el canal hSlo3

Para la subclonación del gen que codifica para el canal de K^+ hSlo3, se realizó una PCR para la inserción del sitio HindIII después del codón de término en el extremo 3'. Se utilizaron 200 μM de dNTPS, una unidad de enzima Phusion® ADN polimerasa de alta fidelidad (New England BioLabs) y agua MiliQ hasta alcanzar el volumen final deseado. Esta reacción se realizó en la solución GC (New England BioLabs).

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado: hSlo3 – pOX	14 µL
Oligo F T3 (5' CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG 3')	0.5 µM
Oligo R Slo3 Hind III (5' GGG AAG CTT GAG TCT AGA ACT AGT ATA GTG GCT 3')	0.5 µM

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Alineamiento	45	20	
Elongación	72	70	
Elongación final	72	600	1

La banda del tamaño esperado se purificó a partir de gel de agarosa.

7.10.2. Digestión del inserto y vector

Las digestiones se realizaron con enzimas de restricción de Fermentas. Las reacciones se incubaron durante 3 h a 37°C. Se utilizó la solución Tango y se ajustó el volumen final con H₂O MilliQ. Las digestiones se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa 1 % y se purificaron las bandas que correspondían a los insertos hSlo3 y mSlo3, y al vector pcDNA 3.1 (-).

7.10.2.1. Digestión del inserto hSlo3

El ADN obtenido con la PCR de la inserción del sitio HindIII se digirió con las enzimas de restricción HindIII y NheI. La siguiente tabla muestra la concentración y las unidades utilizadas para cada una de las reacciones de doble digestión.

Componente	hSlo3
ADN	50 ng
NheI	0.25 unidades
HindIII	0.5 unidades

7.10.2.2. Digestión del inserto mSlo3

Se digirió la construcción mSlo3-pOX con las enzimas NheI y XhoI. La siguiente tabla muestra la concentración y las unidades utilizadas en la doble digestión.

Componente	mSlo3
ADN	200 ng
NheI	0.5 unidad
XhoI	2 unidades

7.10.2.3. Digestión del vector pcDNA 3.1 (-)

El vector pcDNA 3.1 (-) se adquirió por donación de la Dra. Rita Restano Cassulini. Se realizaron dos diferentes digestiones, una que expuso los sitios NheI y HindIII (para ligar con la clona hSlo3) y otra que expuso los sitios NheI y XhoI (para ligar con la clona mSlo3). Las concentraciones de enzimas utilizadas fueron las siguientes.

Componente	pcDNA 3.1 (-)	pcDNA 3.1 (-)
ADN	500 ng	500 ng
NheI	0.5 unidades	0.5 unidades
HindIII	1 unidad	-
XhoI	-	2 unidades

7.10.3. Ligación de los genes que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 con el vector de expresión pcDNA 3.1 (-)

Para la construcciones hSlo3–pcDNA 3.1 (-) y mSlo3–pcDNA 3.1 (-) se utilizó una unidad de ligasa de ADN T4 (Thermo Scientific). El vector (pcDNA 3.1 (-)) y el inserto (hSlo3 o mSlo3) se pusieron en concentraciones finales equivalentes (0.05 μ M). Se utilizó solución de ligasa de ADN T4 y se ajustó con H₂O MiliQ para alcanzar el volumen final de la reacción. Como control negativo se puso una reacción como la descrita anteriormente pero sin ADN de los insertos.

7.10.4. Transformación de productos de ligación

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α con la reacción de ligación experimental y con la ligación control. Se crecieron las bacterias en cajas de LB sólido con ampicilina durante toda la noche.

7.10.5. Verificación de las construcciones

Se realizó extracción de ADN plasmídico de las colonias de ligación experimental con el “kit” Miniprep. 0.5 μ g del ADN obtenido, se digirió durante tres horas con las enzimas de restricción HindIII y NheI para verificar la construcción hSlo3–pcDNA 3.1 (-) y con las enzimas de restricción NheI y XhoI para corroborar la construcción mSlo3–pcDNA 3.1 (-).

Se comprobó la digestión en un gel de agarosa 1 % por electroforesis.

7.11. Cultivo y transfección de células CHO

Las células se adquirieron por donación de la Dra. Rita Restano Cassulini. Se estandarizaron las condiciones óptimas para el cultivo y transfección de células CHO. Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles.

7.11.1. Cultivo y pase de células CHO.

Para establecer el cultivo celular, las células se mantuvieron a 37° C con 5 % de CO₂ en una incubadora (VW Scientific 2100). Se cultivaron en cajas de petri de 3 cm de diámetro y con 3 mL de medio de cultivo Advanced DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies). Las células se sembraron cada 48 horas de acuerdo al siguiente protocolo: como primer paso, se les retiraba el medio de cultivo, se lavaban con 3 mL de PBS (Gibco, Invitrogen), y se retiraba el PBS por medio de succión. Para despegar a las células del fondo de la caja cultivo se les adicionó 1 mL de tripsina (TryPLE™ Express, Gibco, Life Technologies), y se incubó durante un minuto a 37° C o hasta comprobar que todas las células estaban en suspensión mediante observación con un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS 100). La reacción de la tripsina se bloqueó con el mismo volumen de medio completo (DMEM suplementado con suero). Finalmente en una caja de petri nueva que contenía medio completo fresco, se agregaron 200 µL de la suspensión celular del cultivo anterior.

7.11.2. Transfección de células CHO

La transfección se realizó en cultivos celulares con 24 h de cultivo posteriores a un nuevo pase.

En 1 mL de medio de cultivo sin suero se agregaron cuidadosamente 50 µL de lipofectamina (Invitrogen). Después, por goteo, se agregó 1 µg del ADN de interés previamente resuspendido en 1 mL de medio de cultivo sin suero. Se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 45 min para favorecer la formación de liposomas.

Las células se lavaron con 3 mL de medio sin suero. Se retiró el medio sin suero y se agregó el medio con ADN y lipofectamina. Las células se incubaron durante 5 h. Pasado este tiempo se retiró el medio con ADN y lipofectamina y se sustituyó con 3

mL de medio DMEM suplementado con suero o cual fuese su tratamiento. Las células transfectadas se incubaron a 37° C durante 72 h.

7.12. Ensayos de determinación de potencial de membrana en reposo en población de células CHO

Los ensayos de determinación de potencial de membrana en reposo en población de células CHO se realizaron mediante espectrofluorimetría. Como colorante fluorescente se utilizó DiSBAC₂ (3) (ANASPEC) a una concentración final 1 μM. Las mediciones de fluorescencia se hicieron mediante un fluorómetro (Ocean Optics USB4000) empleando una longitud de onda de 485 nm para la excitación del fluoróforo y adquiriendo la fluorescencia de emisión a 550 nm. La intensidad de fluorescencia fue digitalizada y adquirida mediante el programa Spectra Suite (Ocean Optics Inc.).

DiSBAC₂ (3) es un colorante fluorescente que pertenece a la familia del oxonol y que está cargado negativamente. Este se distribuye en las membranas celulares en respuesta al potencial de membrana, uniéndose preferencialmente a membrana depolarizadas. Además presenta la ventaja de que no se une a las membranas de la mitocondria, generalmente hiperpolarizada, por lo que no es necesario agregar desacoplantes mitocondriales para eliminar la contribución del potencial mitocondrial al potencial de membrana plasmática medido con este colorante.

Durante el ensayo de fluorimetría, las células se mantuvieron en un tubo de ensayo a 37° C en suspensión con la ayuda de un mini agitador magnético. Para excitar al oxonol se utilizó un LED azul que excita a 485 nm y se adquirió y registró la emisión a 550 nm con el programa Spectra Suite (Ocean Optics Inc.).

El stock de Gramicidina y DiSBAC₂ (3) se preparó en DMSO a una concentración de 1 mM.

7.12.1. Preparación de células CHO para los ensayos de fluorimetría.

Para estos ensayos utilizamos cultivos de 72 h de células CHO transfectadas o control ($\sim 1 \times 10^6$ células). Como primer paso, las células se desprendieron de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se centrifugaron las células durante seis minutos en una centrífuga clínica (IEC) a 2,000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se les agregó medio de registro Whittens modificado (cero Na^+), cuya composición es (en mM): NMDG-Cl, 100; KCl, 4.7; KH_2PO_4 , 1.2; MgSO_4 , 1.2; Glucosa, 1.5; HEPES, 20; sin lactato ni piruvato con pH de 7.4; se resuspendieron y se transfirieron a un tubo de registro.

7.12.2. Titulación del potencial de membrana en reposo

A las células con medio de registro Whittens modificado se les agregó el colorante de potencial de membrana DiSBAC₂ (3) (oxonol) y se colocaron en la cámara de registro con agitación constante. Se esperó hasta que las células cargaran al colorante y la fluorescencia emitida y registrada se estabilizara (~ 3 min). Para determinar el potencial de reposo de las células, primero se adicionó Gramicidina (SIGMA) a una concentración final $1 \mu\text{M}$ y una vez estabilizada la señal, se hicieron las adiciones secuenciales de KCl. La suspensión inicial contenía 4.7 mM de KCl; las subsecuentes adiciones de KCl llevaron a la solución a concentraciones finales (en mM) de 6.7, 10.7, 18.7, 30.7, 46.7 y 66.7, las cuales correspondían a potenciales de equilibrio para K^+ (E_K) de -80, -64, -49, -36, -25 y -3 mV, respectivamente. Estos valores de potencial se obtuvieron aplicando la ecuación de Nernst, asumiendo que la concentración de K^+ intracelular fue de 120 mM y considerando que el potencial de membrana alcanzado en presencia de Gramicidina correspondía al potencial de equilibrio de K^+ .

7.13. Obtención de Anticuerpos α Slo3

Se realizaron alineamientos entre las secuencias a nivel de aminoácidos de los canales hSlo3 y mSlo3 en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para identificar a las secuencias que comparten ambos canales y seleccionar las posibles regiones antigénicas que pudieran servir como péptido para la obtención de un anticuerpo específico para ambos canales Slo3.

Una vez seleccionadas las secuencias peptídicas compartidas, se recurrió a la base de datos <http://www.uniprot.org/> para realizar un análisis de alineamiento y determinar que la secuencias fueran específicas para los canales Slo3. Se seleccionó una secuencia peptídica y se mandó a sintetizar el péptido antigénico y a desarrollar el anticuerpo a la compañía New England Peptide. Se obtuvieron dos anticuerpos α Slo3, U1493 y U1504.

7.14. Inmunocitoquímicas

Los ensayos de inmunocitoquímica se realizaron en espermatozoides no capacitados de ratón y humano, células CHO transfectadas con hSlo3 o mSlo3 y células CHO sin transfectar. Se probaron los anticuerpos U1493 y U1504 hasta encontrar condiciones óptimas y como bloqueador se utilizó Gelatina. Los lavados con PBS (137 de NaCl, 2.7 de KCl, 10 de Na_2HPO_4 , 2 de KH_2PO_4 , todos en mM, a un pH de 7.4) se repetían tres veces con intervalos de 5 minutos.

Para los ensayos con espermatozoides de humano, las células se obtuvieron por medio de donadores que cumplen con las normas establecidas por la OMS [45]. Para los ensayos con espermatozoides de ratón (Slo3 $-/-$ y CD1), las células fueron obtenidas del epidídimo. Para ambas especies se realizó lo siguiente: se llevó a cabo la técnica de “swim up”, proceso en el que se seleccionan sólo espermatozoides motiles, durante 10 minutos en el caso del ratón y una hora en caso de

espermatozoides de humano. Posteriormente se corroboró en el microscopio que la muestra experimental contenía espermatozoides móviles. Como siguiente paso se fijó la muestra de células adicionando paraformaldehído a una concentración final de 4 % y se colocaron 100 μ L de esta muestra en los pozos de portaobjetos (TGH – Virology), se incubaron durante una hora en una cámara húmeda. Las laminillas se lavaron con 100 μ L de PBS tres veces y se dejaron secar por 30 minutos. Posteriormente se permeabilizaron las células agregando 100 μ L de Tritón 0.1 % (SIGMA), y se incubaron durante 10 minutos. Como paso siguiente, las muestras se lavaron con 100 μ L de PBS y se agregaron 100 μ L de Gelatina 5 % (bloqueador) en cada pozo y se incubaron en una cámara húmeda durante dos horas.

Pasado el tiempo de incubación, se lavó la gelatina y en cada pozo se probaron diferentes condiciones experimentales las cuales fueron: Anticuerpo primario (Ab 1°), Muestra preinmune, Ab 1° + péptido antigénico o sólo péptido antigénico. Se probaron diferentes diluciones hasta encontrar la dilución óptima para los anticuerpos (1:1000, 1:100, 1:1000 + 1:1 con respecto al Ab 1° en volumen y 1:1 con respecto al Ab 1° en peso, respectivamente para cada condición experimental antes mencionada). Las preparaciones se incubaron durante toda la noche a 4° C protegidos de la luz. Después de esta incubación, las preparaciones se lavaron tres veces con 100 μ L de PBS y se agregó el Anticuerpo secundario (Ab 2°) disuelto en PBS 1:100. Las preparaciones con el Ab 2° se incubaron durante una hora en cámara húmeda protegido de la luz. Posteriormente las muestras se lavaron con 100 μ L de PBS y a cada pozo de las laminillas se le agregaron 18 μ L de Citifluor (Electron Microscopy Sciences), se colocó un cubre objetos sobre cada pozo y se selló con barniz transparente.

La preparación de las células CHO para los ensayos de inmunocitoquímica se realizó siguiendo el mismo protocolo antes mencionado para la preparación de los espermatozoides, descartando la parte de “swim up” y movilidad. Las células se

sembraron directamente en los portaobjetos tal y como se describe en la sección de Cultivo y transfección de células CHO. Se hicieron ensayos por separado de células transfectadas y no transfectadas bajo las mismas condiciones de Ab 1°, muestra Preimmune, Ab 1° + péptido, muestra Preimmune + péptido y sólo péptido antigénico, descritas para espermatozoides y humano y ratón.

El Ab 2° utilizado fue el Alexa Fluo® 488 cabra-antipollo (Molecular Probes). Las muestras se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM510 META. Se observaron por lo menos tres campos visuales diferentes por cada experimento. Se excitaron las muestras a 488 nm y se adquirió la imagen emitida a 519 nm.

7.15. Reversión de mutaciones A2216G y C2302T

Para la amplificación de los fragmentos 3 hSlo3-A2216G, A2216G+-A hSlo3, Reversión de mutación A2216G, 3 hSlo3-C2302T, C2302T+-A hSlo3, Reversión de mutación A2216G y C2302T, y A2216G+-C2302T por PCR se utilizó una unidad de la enzima Vent_R® ADN polimerasa (New England BioLabs). Se utilizó solución de reacción Thermopol, dNTPs a 200 µM y MgSO₄ a 3 mM.

Para la amplificación del canal hSlo3, fragmento T3-C2302T, A2216G+-T7 y T3-T7 con reversiones A2216G y C2302T por PCR, se utilizó una unidad de la enzima Phusion® ADN polimerasa de alta fidelidad (New England BioLabs). Se utilizó la solución Phusion High – Fidelity fue 1X y dNTPs a 200 µM.

La concentración de templado, oligonucleótidos y programas utilizados se muestran en el Apéndice.

8. Resultados

8.1. Verificación de la identidad y la integridad molecular de las clonas que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3

Las clonas que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 se encontraban en un vector de expresión heteróloga para ovocitos de *Xenopus laevis* llamado pOX (construcciones hSlo3-pOX y mSlo3-pOX, respectivamente) (**Figura 7**). Analizando las secuencias que corresponden al vector pOX (revisado en: <http://addgene.org/vector-database/3780/>), y a los genes de los canales hSlo3 (NM_001031836.2) y mSlo3 (NM_008432.3), se seleccionaron enzimas de restricción que permitieran obtener patrones de digestión específicos para cada construcción con la finalidad de confirmar que cada clona correspondía a las construcciones de interés.

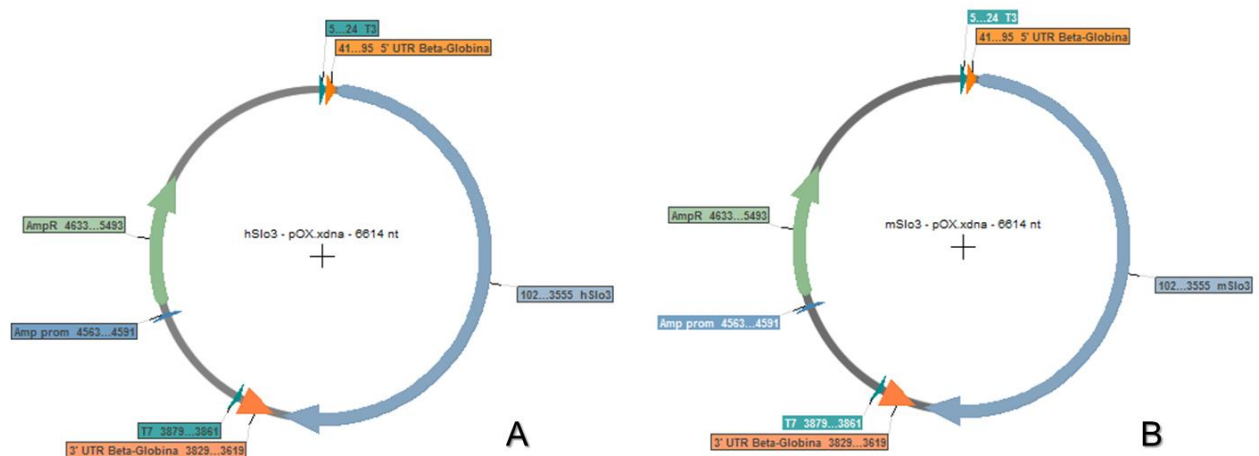


Figura 7: Mapa de las construcciones hSlo3-pOX (A) y mSlo3-pOX (B)

En ambas construcciones se muestran los promotores T3 y T7 (puntas de flecha blanca), las regiones no traducidas 5'y 3' (UTR, por sus siglas en inglés, puntas de flecha anaranjadas); la flecha azul representa a la clona que codifica para los canales Slo3; se muestra el promotor del gen de resistencia (punta de flecha azul) y a la Ampicilina (flecha verde).

Para la construcción hSlo3-pOX se utilizaron tres diferentes enzimas de restricción: NheI, SpeI y NaeI, lo cual nos permitió realizar digestiones simples, dobles y triples de esta construcción. Como se puede observar en la **Figura 8**, las digestiones con las enzimas NheI y SpeI linearizaron completamente a la construcción hSlo3-pOX y produjeron una sola banda del peso correspondiente al gen del canal hSlo3 más el vector pOX, tal como se esperaba. Por otra parte, la digestión de la construcción hSlo3-pOX con la enzima NaeI produjo tres bandas las cuales corresponden a la construcción linearizada debido a una digestión parcial de un porcentaje total de los plásmidos, y dos fragmentos que corresponden a la digestión completa de los plásmidos restantes. Los tres fragmentos, producto de la digestión con la enzima NaeI corresponden a los tamaños esperados. De manera consistente, la digestión doble con

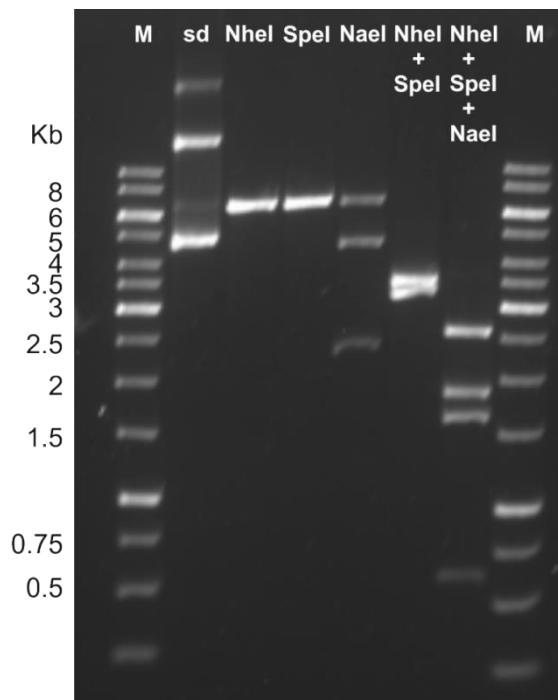


Figura 8: Patrón de digestión de la construcción hSlo3-pOX.

En cada carril se muestran los fragmentos esperados del plásmido hSlo3-pOX en las digestiones con las enzimas NheI, SpeI y NaeI, solas o combinadas. De acuerdo a los tamaños esperados y observados, se infirió que la construcción analizada era, efectivamente, hSlo3-pOX. El voltaje aplicado a la cámara de electroforesis fue de 80 volts, se cargaron ~200 ng de ADN por cada reacción. *M*, marcador; *Kb*, Kilobases; *sd*, ADN sin digerir.

las enzimas NheI y SpeI generó dos fragmentos como se esperaba, mientras que una digestión triple con todas las enzimas (NheI, SpeI más NaeI) produjo los cuatro fragmentos teóricos correspondientes a la construcción hSlo3–pOX (**Figura 8**).

Para la construcción mSlo3–pOX se utilizaron cuatro diferentes enzimas de restricción: SpeI, XhoI y HindIII y SacI, lo cual nos permitió realizar digestiones simples y dobles de esta construcción. Como se puede observar en la **Figura 9**, las digestiones con las enzimas SpeI o XhoI linearizaron completamente a la construcción mSlo3–pOX y produjeron una sola banda del peso correspondiente al gen del canal mSlo3 más el vector pOX, tal como se esperaba. La digestión con la enzima HindIII produjo dos bandas, una de ~5700 y otra de ~700 pb, tal como se esperaba. Por otra parte, la digestión de la construcción mSlo3–pOX con la enzima SacI produjo cuatro fragmentos los cuales corresponden a la construcción linearizada debido a una digestión parcial de un porcentaje del total de los plásmidos, y tres fragmentos que corresponden a la digestión completa de los plásmidos restantes. Los cuatro fragmentos, producto de la digestión con la enzima SacI, corresponden a los tamaños esperados. De manera consistente, la digestión doble con las enzimas SpeI y XhoI generó los dos fragmentos teóricos correspondientes al gen que codifica para mSlo3 y al vector pOX (**Figura 9**).

Una segunda estrategia utilizada para verificar la identidad e integridad de las construcciones fue secuenciar las clonas con oligonucleótidos específicos. Los resultados de la secuenciación de la clona del canal mSlo3 nos indican que la construcción utilizada en este trabajo presenta una identidad del 100 % en la secuencia nucleotídica del gen del canal mSlo3 contenido en el plásmido con respecto al gen del mismo canal reportado en GeneBank (datos no mostrados). De manera consistente, al hacer la traducción de la secuencia nucleotídica del gen mSlo3, podemos confirmar un 100 % de identidad en la secuencia de aminoácidos al compararla con la reportada en GeneBank para el mismo gen (**Figura 10**). Sin

embargo para la clona correspondiente a hSlo3, se detectaron tres mutaciones a nivel nucleótido: un cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 771 (C771T), una sustitución de la adenina (A) por una guanina (G) en la posición 2216 (A2216G) y un tercer cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 2302 (C2302T) (**Figuras 11 y 12**). Las mutaciones A2216G y C2302T originan un cambio a nivel aminoácido, sustituyendo una arginina (R) por una lisina (K) en la posición 739 (R739K) y al triptófano (W) original por una arginina (R) en la posición 788 (W788R) (**Figura 13**), respectivamente. El cambio de la citosina por una timina en la posición 771 produce una sustitución conservada, sin repercusión alguna en la secuencia de la proteína.

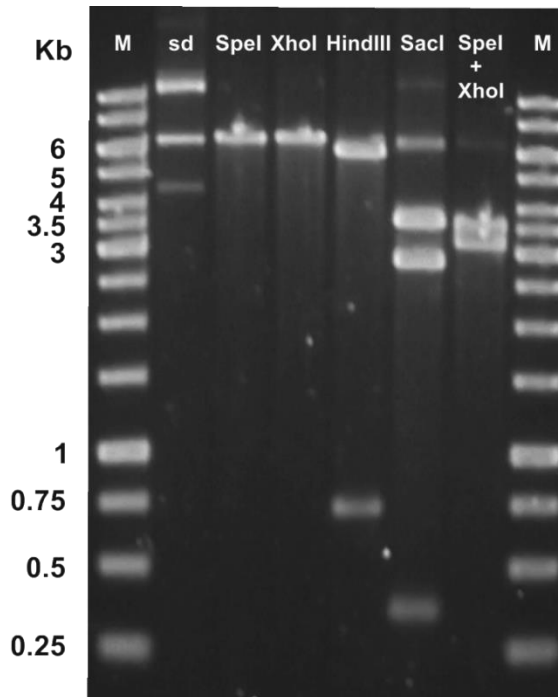


Figura 9: Patrón de digestión de la construcción mSlo3-pOX.

En cada carril se muestran los fragmentos correspondientes a la digestión de la construcción mSlo3-pOX con las diferentes enzimas de restricción ensayadas. De acuerdo a los tamaños esperados y observados, concluimos que la construcción obtenida se trataba, efectivamente, de mSlo3-pOX. El voltaje aplicado a la cámara de electroforesis fue de 80 volts, se cargaron ~200 ng de ADN por cada reacción. *M*, marcador; *Kb*, Kilobases; *sd*, ADN sin digerir.

Alineamiento entre mSlo3 - Gene Bank y mSlo3 - secuencia armada . Longitud 1121
 Score = 2321 bits (6016), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
 Identidad = 1121/1121 (100%), Positivos = 1121/1121 (100%), Gaps = 0/1121 (0%)

Armada	1	MSQTLLEDLSLNQKELTETSCTIEIQAAFILSSLATFFGGLIILFLFRIALKSSRSWKYVKG	60
GeneBank	1	MSQTLLEDLSLNQKELTETSCTIEIQAAFILSSLATFFGGLIILFLFRIALKSSRSWKYVKG	60
Armada	61	PRGLELEFSSRRRIEANPLRKLYFHGVFRQRIEMLLSAQTVVGGVVLVILVFLVLSIGSLVIY	120
GeneBank	61	PRGLELEFSSRRRIEANPLRKLYFHGVFRQRIEMLLSAQTVVGGVVLVILVFLVLSIGSLVIY	120
Armada	121	FINSMDPVRRCSSYEDKIVHVDLSFNAAFSSFYFGLRFWAAEDKIKFWLEMNSIVDI FTIP	180
GeneBank	121	FINSMDPVRRCSSYEDKIVHVDLSFNAAFSSFYFGLRFWAAEDKIKFWLEMNSIVDI FTIP	180
Armada	181	PTFISYYLKSNNWGLRFLRALRLELLEPKILQILQVIKTSNSVKLSKLLSIVISTWFTAAG	240
GeneBank	181	PTFISYYLKSNNWGLRFLRALRLELLEPKILQILQVIKTSNSVKLSKLLSIVISTWFTAAG	240
Armada	241	FLHLVENSNGDPWLNGRNSQTSYFESIYLVATMSTVGFQDVVAKTSLGRIFIVFFTLGS	300
GeneBank	241	FLHLVENSNGDPWLNGRNSQTSYFESIYLVATMSTVGFQDVVAKTSLGRIFIVFFTLGS	300
Armada	301	LILFANYIPEMVELFSTRKKYTKPYEAVKGGKFI VVCGNITVDSVTAFLRNFLHWKSGEI	360
GeneBank	301	LILFANYIPEMVELFSTRKKYTKPYEAVKGGKFI VVCGNITVDSVTAFLRNFLHWKSGEI	360
Armada	361	NIEIVFLGETLPCELELETLKCHTSCNFCVCGTALKFEDLKRVAENSEACLILANHFCS	420
GeneBank	361	NIEIVFLGETLPCELELETLKCHTSCNFCVCGTALKFEDLKRVAENSEACLILANHFCS	420
Armada	421	DLHDEDNSNIMRVLSIKNYYPQTRVIIQILQSQNKVFLSKIPNWDWSAGDNILCFAELKL	480
GeneBank	421	DLHDEDNSNIMRVLSIKNYYPQTRVIIQILQSQNKVFLSKIPNWDWSAGDNILCFAELKL	480
Armada	481	GFIAQGCLVPLGCTFLTLTFLIEQONQKVFPKHPWQKHFLNGLKKNILTQRLSNDFVGMTFP	540
GeneBank	481	GFIAQGCLVPLGCTFLTLTFLIEQONQKVFPKHPWQKHFLNGLKKNILTQRLSNDFVGMTFP	540
Armada	541	QVSRCLFVKLNLMLIAIQHKPFHSCCTLILNPSQVRLNKDTLGFFIADSSKAVKRAFF	600
GeneBank	541	QVSRCLFVKLNLMLIAIQHKPFHSCCTLILNPSQVRLNKDTLGFFIADSSKAVKRAFF	600
Armada	601	YCSNCHSDVCNPELIGKCNCKIKSRQQLIAPTIMVMKSSLTDFTTSSHIHASMSTEIHTC	660
GeneBank	601	YCSNCHSDVCNPELIGKCNCKIKSRQQLIAPTIMVMKSSLTDFTTSSHIHASMSTEIHTC	660
Armada	661	FSREQPSLITITTNRPPTNDTVDLDDMLDSSGMFHWCRAMPLDKVVLKRSEKAKHEFQNH	720
GeneBank	661	FSREQPSLITITTNRPPTNDTVDLDDMLDSSGMFHWCRAMPLDKVVLKRSEKAKHEFQNH	720
Armada	721	IVVCVFGDAQCTLVGLRNFVMPLRASNYTRQELKDIVFIGSLEYFQREWRFLRNFPKIHI	780
GeneBank	721	IVVCVFGDAQCTLVGLRNFVMPLRASNYTRQELKDIVFIGSLEYFQREWRFLRNFPKIHI	780
Armada	781	MPGSALYMGDLIAVNVEQCSMCVILATPYKALSSQILVDTEAIMATLNIQSLRITSPTPG	840
GeneBank	781	MPGSALYMGDLIAVNVEQCSMCVILATPYKALSSQILVDTEAIMATLNIQSLRITSPTPG	840
Armada	841	SSKSEVKPSSAFDSKERKQRYKQIPIILTELKNPSNIHFIEQMGGLDGMLKGTSLHLSTSF	900
GeneBank	841	SSKSEVKPSSAFDSKERKQRYKQIPIILTELKNPSNIHFIEQMGGLDGMLKGTSLHLSTSF	900
Armada	901	STGAVFSDTFLDSSLATSFYNYHVVELLQMLVTGGISSEMEHYLVKEKPKYKTTDDYEAIK	960
GeneBank	901	STGAVFSDTFLDSSLATSFYNYHVVELLQMLVTGGISSEMEHYLVKEKPKYKTTDDYEAIK	960
Armada	961	SGRTRCKLGLLSLDQTVLSGINPRKTFGQFCGSLDNFGILCVGLYRMIDEEEPSQEHKR	1020
GeneBank	961	SGRTRCKLGLLSLDQTVLSGINPRKTFGQFCGSLDNFGILCVGLYRMIDEEEPSQEHKR	1020
Armada	1021	FVITRPSNECHLLPSDLVFCAPFNNTTCGKSDSSPSIQAQNNSTNATTPLAQGSNFFDHS	1080
GeneBank	1021	FVITRPSNECHLLPSDLVFCAPFNNTTCGKSDSSPSIQAQNNSTNATTPLAQGSNFFDHS	1080
Armada	1081	HADESHDLYPVDDTGERWSQHHSRVYPLDITLDASDIVQEK 1121	
GeneBank	1081	HADESHDLYPVDDTGERWSQHHSRVYPLDITLDASDIVQEK 1121	

Figura 10: Alineamiento entre mSlo3-GeneBank y mSlo3-Secuencia armada.

El alineamiento muestra un 100 % de identidad a nivel aminoácido. El alineamiento se realizó en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, comparando la secuencia de mSlo3 en esta base de datos (GeneBank) y la secuencia completa obtenida (Armada).


```

hSlo3 GeneBank 501>gtggagatgaattcaatcgtagacatctttaccatcccaccaacctttattcttattttgaaagacaattggctaggtttaaggttccaaagacc>600
Secuencia armada 501>GCTGGAGATGAATTCAATCGTAGACATCTTTACCATCCCACCAACCTTTATTCTTATTATTTGAAGAGCAATGGCTAGGTTAAGGTTCCCTAAGAGCC>600

601>ttggcctgctagaactccctcaaatcttgcgaattctcaagagccatcaagaccagtaactcaqtgaagttttccaaactgctgcaataattctcagta>700
601>TTGGCCTGCTAGAACTCCCTCAAATCTTGCAAATTTACGAGCCATCAAGACCAGTAACCTCAGTGAAGTTTTCCAAACCTGCTCAATAATTCTCAGTA>700

701>ctcgttcaacagctgcccattcattcaactggtggaattctggtgataccctggctcaaaaggtagaatcacaagaatataatcattttgagcaat>800
701>CCTGGTTCACAGCTGCCGGATTCATTCACCTGGTGGAAATTTCTGGTATCCCTGGCTCAAAGGTAGAAATCACAAGAATATATCATATTTTGAGTCAAT>800

801>ttacctggtcattgcaacaacgtcaacggtgatttggagatggtgtagcaagacaaccttaggaacgacctcaatcatttcttcaactggggagt>900
801>TTACCTGGTCAATGCAACAACGTCAACCGTTGGATTTGGAGATGTTGGTAGCCAAGACATCCTTAGGACGGACCTTCATCATGTTCTTCACACTGGGGAGT>900

901>ttgataattttgcgaactatatacctgaaatggtggaactgtttgctaacaagaggaatacaccagttccatgaagcaactcaaaagaaagttta>1000
901>TTGATATTTTGCGAACATATACCTGAAATGGTGGAACTGTTTGTCTAACCAAGGAAATACACCAGTTCCTATGAGCACTCAAAGGAAAGAAAGTTTA>1000

1001>ttgggtctgtggaacaactcactgtagcaactgtgacgcttctcctgaggaatttccctccgacagaagtcaggagagatcaaacactgaaattgttttcc>1100
1001>TTGGGTCTGTGGAACAACATCACTGTGACAGTGTACCGCTTCTCCTGAGGAATTTCCCTCCGACAGAAGTCAGGAGAGATCAACACTGAAATTTGTTTCC>1100

```

hSlo3 GeneBank
Secuencia armada

Figura 11: Mutación C771T

La secuencia armada del gen hSlo3 presentó un cambio de una citosina por una timina en la posición 771 (C771T). Comparación de las secuencias del canal hSlo3-pOX y del gen hSlo3 reportado en GeneBank en la región que corresponde de la base 501 a la 1100. En minúsculas se muestra la secuencia de hSlo3 reportada de GeneBank (Número de acceso: NM_001031836.2) y en mayúsculas se muestra la secuencia obtenida. En rojo se muestra una mutación identificada, una Citosina por una Timina. Los números indican las pares de bases de cada una de las secuencias.

```

hSlo3 GeneBank 2101>actctgaaacgaactgccaagtcaaaagtataaagtttcggaaccatattgtagcatgttatttggagatgcccaactcagcccagatggggcttcggaact>2200
Secuencia armada 128>ACTCTGAAACGAACCTGGCAAGTCAAAGTATAAAGTTTCGGAACCATATTGTAGCATGTGATTTGGAGATGCCCACTCAGCCCCGATGGGGCTTCGGAACCT>227

2201>ttgtaattgccccttggagccagcaactataccaggaagagctgaaagacatagtttcaattgggtctctggaactatctacagagagaatggcgattct>2300
228>TTGTAATGCCCTTGAAGCCAGCAACTATACCAGGAAGAGCTGAAAGACATAGTGTTCATTGGGTCTCTGGACTATCTACAGAGAGAATGGCGATTCT>327

2301>ctggaattttcccagatacattctgctggtatgcaactttattctggagacctccatggcgccaacatagagcaatgctccatggtgctgctgtcttg>2400
328>CTGGAATTTTCCCAGATATACATTTCTGCTGGATGTGCACTTTTATTCTGGAGACCTCCATGGGGCAACATAGAGCAATGCTCCATGTGTGCTGTCTTG>427

2401>tcccccccccccagccatcaagcaacaacgactttgtagacacagaagccatcattgcaaacctcaccatcggaaccttggcaattgcaactcctctct>2500
428>TCCCCCCCCCCCAGCCATCAAGCAACAGACTTTGGTAGACACAGAAGCCATCATGGCAACCCCTCACCATCGGATCCTTGCAAAATGACTCCTCCTCTG>527

2501>accgctcaccctcagtgctcaagagagactccaggttacacaattgacataatgagaaatcaaaactgcccgaagtcacctatccttaactgaaactgaaaa>2600
528>ACCCGTCACCCTCAGTGTGAGAGAGACTCCAGGTTACACAATGGACATAATGAGAAATCAAACCTGCCGAAAAGTCCCTATCCTTACTGAACTGAAAA>627

2601>tcctccaacattcaactttattgaaacagcttgggtgactggaagggtccctccaaagaaacaaatctgcatcagcaactgcctttttacgggcaactgtt>2700
628>TCCTCCAACTTCACTTTATTGAACAGCTTGGTGGACTGGAAGGTCCTCCAAAGAAACAAATCTGCATCTCAGCACTGCCTTTTCTCAGGGCACTGTT>727

```

hSlo3 GeneBank 2
Secuencia armada

Figura 12: Mutaciones A2216G y C2302T.

La región que abarca de la base 2101 a la 2700 de la secuencia armada del gen hSlo3 contiene dos cambios de base en las posiciones 2216 (A2216G) y 2302 (C2302T). Comparación de las secuencias del canal hSlo3-pOX y del gen hSlo3 reportado en GeneBank en la región que corresponde de la base 2101 a la 2700. En minúsculas se muestra la secuencia de hSlo3 obtenida de GeneBank (Número de acceso: NM_001031836.2) y en mayúsculas se muestra la secuencia obtenida en nuestra secuenciación. En rojo se muestran las mutaciones identificadas, una Guanina (G) por una Adenina (A) y una Citosina (C) por una Timina (T). Los números indican los pares de bases de cada una de las secuencias.

Alineamiento entre hSlo3-GeneBank y hSlo3-Secuencia armada

Longitud: 1149

Score = 2367 bits (6133), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
 Identidad = 1147/1149 (99%), Positivos = 1148/1149 (99%), Gaps = 0/1149 (0%)

Armada	1	MFQTKLRNETWEDLPKMSCTTEIQAAFILSSFVTFSSGLIILLIFRLIWRSVKKWQIIKG	60
GeneBank	1	MFQTKLRNETWEDLPKMSCTTEIQAAFILSSFVTFSSGLIILLIFRLIWRSVKKWQIIKG	60
Armada	61	TGIILELFTSGTIARSHVRSLSHFQGGQFRDHIEMLLSAQTFVGVVLVILVFVLSIGSLIYY	120
GeneBank	61	TGIILELFTSGTIARSHVRSLSHFQGGQFRDHIEMLLSAQTFVGVVLVILVFVLSIGSLIYY	120
Armada	121	FINSADPVGSCSSYEDKTIPIIDLVFNAFFSFYFGLRFMAADDKIKFWLEMNSIVDIPTIP	180
GeneBank	121	FINSADPVGSCSSYEDKTIPIIDLVFNAFFSFYFGLRFMAADDKIKFWLEMNSIVDIPTIP	180
Armada	181	PTFISYYLKSNNWGLRFLRALRLELQPILQILRAIKTNSNVKFSKLLSIIILSTWFTAAG	240
GeneBank	181	PTFISYYLKSNNWGLRFLRALRLELQPILQILRAIKTNSNVKFSKLLSIIILSTWFTAAG	240
Armada	241	FIHLVENSQDPWLKGRNSQNIYSYFESIYLVMAATSTVGFQDVVAKTSLGRTFIMFFTLGS	300
GeneBank	241	FIHLVENSQDPWLKGRNSQNIYSYFESIYLVMAATSTVGFQDVVAKTSLGRTFIMFFTLGS	300
Armada	301	LILFANYIPEMVELFANKRKYTSSYEALKGKKFIVVCGNITVDSVTAFLRNFRLDKSGEI	360
GeneBank	301	LILFANYIPEMVELFANKRKYTSSYEALKGKKFIVVCGNITVDSVTAFLRNFRLDKSGEI	360
Armada	361	NTEIVFLGETPPSLELETIFKCYLAYTTFISGSAMKWEDLRRVAVESAEACLIIANPLCS	420
GeneBank	361	NTEIVFLGETPPSLELETIFKCYLAYTTFISGSAMKWEDLRRVAVESAEACLIIANPLCS	420
Armada	421	DSHAEDISNIMRVLSIKNYDSTRIIIQILQSHNKVYLPKIPSWNWDGDNICFAELKL	480
GeneBank	421	DSHAEDISNIMRVLSIKNYDSTRIIIQILQSHNKVYLPKIPSWNWDGDNICFAELKL	480
Armada	481	GFLAQQCLVPGCLCTFLTSLFVEQNKVMKPKQWKKHFLNSMKNKILTQRLSDDFAGMSFP	540
GeneBank	481	GFLAQQCLVPGCLCTFLTSLFVEQNKVMKPKQWKKHFLNSMKNKILTQRLSDDFAGMSFP	540
Armada	541	EVARLCFLKMHLIIIIEYKSLFTDGFGLILNPPQVIRKNTLGGFFIAETPKDVRRAL	600
GeneBank	541	EVARLCFLKMHLIIIIEYKSLFTDGFGLILNPPQVIRKNTLGGFFIAETPKDVRRAL	600
Armada	601	FYCSVCHDDVFPELITNCGCKSRSRQHITVPSVKRMKKCLKGISSRISGQDPPRVSAS	660
GeneBank	601	FYCSVCHDDVFPELITNCGCKSRSRQHITVPSVKRMKKCLKGISSRISGQDPPRVSAS	660
Armada	661	TSSISNFTTRTLQHDVEQDSDQLDSSGMFHWCKPTSLDKVTLKRTGKSKYKERNHIVACV	720
GeneBank	661	TSSISNFTTRTLQHDVEQDSDQLDSSGMFHWCKPTSLDKVTLKRTGKSKYKERNHIVACV	720
Armada	721	FGDAHSAPMGLRNFVMPILKASNYTRKELKDIVFIGSLDYLQREWRFLRNFQIYILPGCA	780
GeneBank	721	FGDAHSAPMGLRNFVMPILKASNYTRKELKDIVFIGSLDYLQREWRFLRNFQIYILPGCA	780
Armada	781	LYSGDLHAANIEQCSMAVLSPPPQSSNQTLDVTEAIMATLTIGSLQIDSSSDPSPSVS	840
GeneBank	781	LYSGDLHAANIEQCSMAVLSPPPQSSNQTLDVTEAIMATLTIGSLQIDSSSDPSPSVS	840
Armada	841	EETPGYTNGHNEKSNCRKVPILTELKNPSNIHFIEQLGGLEGSLOETNLHLSTAFSTGTV	900
GeneBank	841	EETPGYTNGHNEKSNCRKVPILTELKNPSNIHFIEQLGGLEGSLOETNLHLSTAFSTGTV	900
Armada	901	FSGSFLDSLALATAFYNYHVLELLQMLVLTGGVSSQLEQHLQDKVKYGVADSCSLLSGRNR	960
GeneBank	901	FSGSFLDSLALATAFYNYHVLELLQMLVLTGGVSSQLEQHLQDKVKYGVADSCSLLSGRNR	960
Armada	961	CKLGLLSLHETILSDVNPRNTFGQLFCGSLDLFGILCVGLYRIIDEEELNPNKRFVITR	1020
GeneBank	961	CKLGLLSLHETILSDVNPRNTFGQLFCGSLDLFGILCVGLYRIIDEEELNPNKRFVITR	1020
Armada	1021	PANEFKLLPSDLVFCAPFSTACYKRNEEFSLQKSYEIVNKASQTETETHSDTNCPTIDS	1080
GeneBank	1021	PANEFKLLPSDLVFCAPFSTACYKRNEEFSLQKSYEIVNKASQTETETHSDTNCPTIDS	1080
Armada	1081	VTETLYSPVYSYQPRNTNSLSFFPKQIAWNQSRNTNSIISSQIPLGDNKENERKTSDEVYDE	1140
GeneBank	1081	VTETLYSPVYSYQPRNTNSLSFFPKQIAWNQSRNTNSIISSQIPLGDNKENERKTSDEVYDE	1140
Armada	1141	DPFAYSEPL 1149	
GeneBank	1141	DPFAYSEPL 1149	

Figura 13: Alineamiento entre hSlo3 - GeneBank y hSlo3 - Secuencia armada.

El alineamiento muestra un 99 % de identidad a nivel aminoácido. El alineamiento se realizó en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, comparando la secuencia de hSlo3 en esta base de datos (GeneBank) y la secuencia completa obtenida (Armada). En rectángulos azules se muestran dos mutaciones, R739K y W788R.

8.2. Subclonación de los canales hSlo3 y mSlo3 en el vector de expresión pcDNA 3.1 (-).

Como se mencionó anteriormente, el estudio de las propiedades biofísicas del canal hSlo3 se ha dificultado debido a la expresión exclusiva de este canal en la línea germinal masculina. Como estrategia alternativa para su estudio, en este trabajo propusimos establecer un sistema de expresión heteróloga para facilitar su caracterización. El primer paso para cumplir con este objetivo fue subclonar a los genes que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3 en el vector pcDNA 3.1 (-), el cual nos permitiría expresar estos canales en la línea celular de mamífero de ovario de hámster chino (CHO).

Para esto se hizo un análisis de las construcciones del vectores pOX que contienen a los canales Slo3 y del vector de expresión pcDNA 3.1 (-) para determinar los sitios de restricción que pudieran ser utilizados para la subclonación.

En el caso de la clona que codifica para hSlo3, se decidió utilizar los sitios NheI y HindIII. Sin embargo la clona original no presentaba éste último sitio, por lo que se estandarizaron las condiciones para insertar, por PCR, el sitio HindIII en el extremo 3' del gen del canal hSlo3, después del codón de término (**Figura 14**). Para la clona que codifica para mSlo3, se decidió utilizar los sitios NheI y XhoI ya presentes en la construcción mSlo3-pOX en los extremos 5' y 3' del gen del canal mSlo3, respectivamente.

Una vez seleccionados e insertados los nuevos sitios de restricción en los genes de los canales Slo3, se extrajo del vector pOX el casete correspondiente al gen de mSlo3 (**Figura 15**) y se purificaron las bandas obtenidas por columna. De igual manera, linearizamos al vector pcDNA 3.1 (-) con las enzimas de restricción correspondientes para cada canal, se purificó al vector linearizado y se procedió a la ligación del vector con los genes de los canales (**Figura 16**).

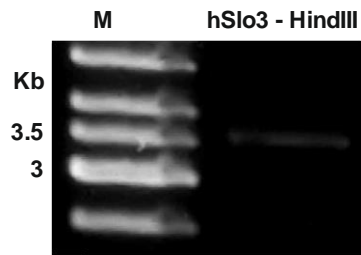


Figura 14: Inserción del sitio HindIII en hSlo3.

El sitio HindIII se insertó en la clona que codifica para el canal hSlo3. El tamaño observado coincide con el tamaño esperado (~3.5 Kb). La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder. *Kb*, Kilobases.

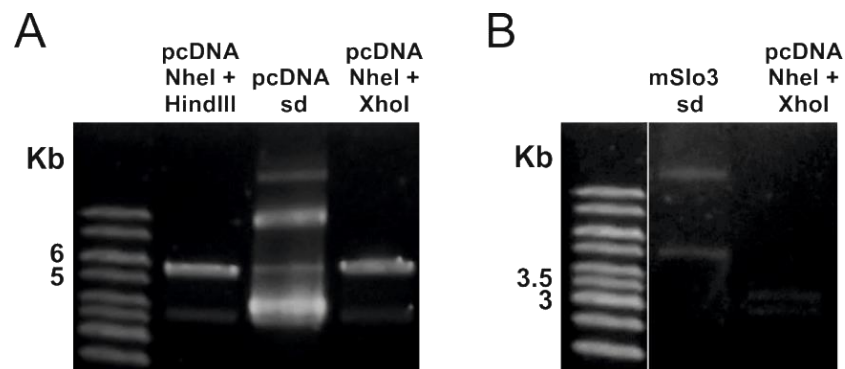


Figura 15: Digestiones del vector pcDNA 3.1 (-) y de la construcción mSlo3-pOX.

A Bandas correspondientes a la digestión del vector pcDNA 3.1 (-) con dos diferentes pares de enzimas de restricción. La digestión NheI + HindIII prepara al vector para hSlo3, mientras que la digestión NheI + XhoI corresponde al vector abierto para la inserción de mSlo3; en ambos casos el tamaño observado (~5.4 Kb) coincide con el esperado. **B**, La digestión de mSlo3 - pOX con NheI + XhoI, produjo dos fragmentos cuyos tamaños esperados fueron de 3.2 y 3.5 Kb. Estos fragmentos corresponden al vector pOX y a mSlo3, respectivamente. Los carriles corresponden al mismo gel, por comodidad visual, se excluyeron carriles ajenos para este experimento. Tanto en **A** como en **B**, se observan muestras sin digerir (*sd*). La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder. *Kb*, Kilobases.

Para determinar si las clonas se encontraban completas verificamos su integridad por patrones de digestión (**Figura 16**). Posteriormente, secuenciamos las construcciones con oligonucleótidos específicos para cada plásmido y se comprobó la integridad de la clona que codifica para los canales hSlo3 y mSlo3 (**Figura 17**).

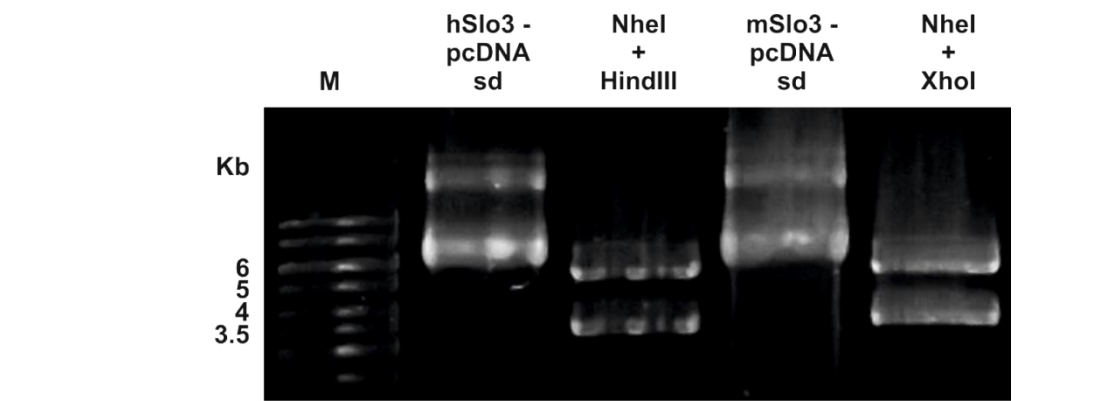


Figura 16: Los patrones de digestión de las construcciones Slo3- pcDNA 3.1 (-) confirman la ligación correcta del vector con los canales.

Para confirmar de manera rápida la correcta incorporación de las clonas que codifican para los canales Slo3, al vector pcDNA 3.1 (-), verificamos los patrones de digestión de nuestras construcciones. Para la construcción de hSlo3-pcDNA 3.1 (-) utilizamos las enzimas NheI y HindIII y para mSlo3-pcDNA 3.1 (-) NheI y XhoI. En ambos casos se observaron dos bandas de ~5.4 Kb correspondientes al canal para hSlo3 o mSlo3. La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Kb, Kilobases.

Alineamiento entre hSlo3-GeneBank y hSlo3-Secuencia armada		Alineamiento entre mSlo3 - Gene Bank y mSlo3 - secuencia armada - Longitud 1121	
Longitud: 1149		Longitud 1121	
Score = 247 Hits (6133), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identidad = 1147/1149 (99%), Positivos = 1148/1149 (99%), Gaps = 0/1149 (0%)		Score = 221 Hits (6016), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identidad = 1121/1121 (100%), Positivos = 1121/1121 (100%), Gaps = 0/1121 (0%)	
Armada 1	MPQTKLNEWEDLPMSCCTEIQAFILSSVFFVFGSLLILLFRLIIRNSVKKWQIING	GeneBank 1	MSQTLLESLNQKELTETSCTIEQAQAFILSSVFFVFGSLLILLFRLIIRNSVKKWQIING
GeneBank 1	MPQTKLNEWEDLPMSCCTEIQAFILSSVFFVFGSLLILLFRLIIRNSVKKWQIING	Armada 61	FRGLLELSSRRLEANEFLKLYFHGVRQRIMLLSAQTVGGVQLVILVFLVLSIGSLVY
Armada 61	TCGILLEFTSCTIARSHVSLHFGQDFRDIHEMLSAQTFVGGVQLVILVFLVLSIGSLVY	GeneBank 61	FRGLLELSSRRLEANEFLKLYFHGVRQRIMLLSAQTVGGVQLVILVFLVLSIGSLVY
GeneBank 61	TCGILLEFTSCTIARSHVSLHFGQDFRDIHEMLSAQTFVGGVQLVILVFLVLSIGSLVY	Armada 121	FINSMDVPRCSYEDKIVVHDLDFNAFFSFFGLRFAAEDKIKFWELEMSIVDITFTIP
Armada 121	FINSADPVGSCSYEDKIVDLENNAFFSFFGLRFAAEDKIKFWELEMSIVDITFTIP	GeneBank 121	FINSMDVPRCSYEDKIVVHDLDFNAFFSFFGLRFAAEDKIKFWELEMSIVDITFTIP
GeneBank 121	FINSADPVGSCSYEDKIVDLENNAFFSFFGLRFAAEDKIKFWELEMSIVDITFTIP	Armada 181	PTFSIYLKSNWGLRFRALRLELFLQIILRAIKTNSNVKSKLSIILSTWFTAAG
Armada 181	PTFSIYLKSNWGLRFRALRLELFLQIILRAIKTNSNVKSKLSIILSTWFTAAG	GeneBank 181	PTFSIYLKSNWGLRFRALRLELFLQIILRAIKTNSNVKSKLSIILSTWFTAAG
GeneBank 181	PTFSIYLKSNWGLRFRALRLELFLQIILRAIKTNSNVKSKLSIILSTWFTAAG	Armada 241	FHLVENSQDFWLRKNSQMSYFESYILVMTATSTVFGDVAKTSLSGRIFVFFTLGS
Armada 241	FHLVENSQDFWLRKNSQMSYFESYILVMTATSTVFGDVAKTSLSGRIFVFFTLGS	GeneBank 241	FHLVENSQDFWLRKNSQMSYFESYILVMTATSTVFGDVAKTSLSGRIFVFFTLGS
GeneBank 241	FHLVENSQDFWLRKNSQMSYFESYILVMTATSTVFGDVAKTSLSGRIFVFFTLGS	Armada 301	LILFANYIFEMVLEFANKRKYTSVEALGKRFIVVCGNITVDSVTAFLRNLKRSGEI
Armada 301	LILFANYIFEMVLEFANKRKYTSVEALGKRFIVVCGNITVDSVTAFLRNLKRSGEI	GeneBank 301	LILFANYIFEMVLEFANKRKYTSVEALGKRFIVVCGNITVDSVTAFLRNLKRSGEI
GeneBank 301	LILFANYIFEMVLEFANKRKYTSVEALGKRFIVVCGNITVDSVTAFLRNLKRSGEI	Armada 361	NTEVFLGTFEPLSELETFIKYLAIVTTFISGAMWEDLRVAVESAACILIANPLCS
Armada 361	NTEVFLGTFEPLSELETFIKYLAIVTTFISGAMWEDLRVAVESAACILIANPLCS	GeneBank 361	NTEVFLGTFEPLSELETFIKYLAIVTTFISGAMWEDLRVAVESAACILIANPLCS
GeneBank 361	NTEVFLGTFEPLSELETFIKYLAIVTTFISGAMWEDLRVAVESAACILIANPLCS	Armada 421	DSHAEENIMMVLISIKHYDSTRITIIQLGSHNNVYLFKIPSNMNTGICNICFAELKL
Armada 421	DSHAEENIMMVLISIKHYDSTRITIIQLGSHNNVYLFKIPSNMNTGICNICFAELKL	GeneBank 421	DSHAEENIMMVLISIKHYDSTRITIIQLGSHNNVYLFKIPSNMNTGICNICFAELKL
GeneBank 421	DSHAEENIMMVLISIKHYDSTRITIIQLGSHNNVYLFKIPSNMNTGICNICFAELKL	Armada 481	GFIAQGLVGLCTFTLSLVEQNKVMPKQTKRKHFLNSMKNLITQLSDDFAGMSFP
Armada 481	GFIAQGLVGLCTFTLSLVEQNKVMPKQTKRKHFLNSMKNLITQLSDDFAGMSFP	GeneBank 481	GFIAQGLVGLCTFTLSLVEQNKVMPKQTKRKHFLNSMKNLITQLSDDFAGMSFP
GeneBank 481	GFIAQGLVGLCTFTLSLVEQNKVMPKQTKRKHFLNSMKNLITQLSDDFAGMSFP	Armada 541	EVARLCEFLKMHLLLIIAYEVSLETFDGCCLLIMFFQVIRIKNTLGFIAFTKQVRRAL
Armada 541	EVARLCEFLKMHLLLIIAYEVSLETFDGCCLLIMFFQVIRIKNTLGFIAFTKQVRRAL	GeneBank 541	EVARLCEFLKMHLLLIIAYEVSLETFDGCCLLIMFFQVIRIKNTLGFIAFTKQVRRAL
GeneBank 541	EVARLCEFLKMHLLLIIAYEVSLETFDGCCLLIMFFQVIRIKNTLGFIAFTKQVRRAL	Armada 601	FYCSVCHDDVIFELLITNCCCKRSBQHTVFSVKMCKKLGKISRIISQDSDPRVYAS
Armada 601	FYCSVCHDDVIFELLITNCCCKRSBQHTVFSVKMCKKLGKISRIISQDSDPRVYAS	GeneBank 601	FYCSVCHDDVIFELLITNCCCKRSBQHTVFSVKMCKKLGKISRIISQDSDPRVYAS
GeneBank 601	FYCSVCHDDVIFELLITNCCCKRSBQHTVFSVKMCKKLGKISRIISQDSDPRVYAS	Armada 661	TSISINFTTTEHQHVDQSDQLDSSGMFHWCKPTSLDRVTLKRTGSKYKFRMHIWACV
Armada 661	TSISINFTTTEHQHVDQSDQLDSSGMFHWCKPTSLDRVTLKRTGSKYKFRMHIWACV	GeneBank 661	TSISINFTTTEHQHVDQSDQLDSSGMFHWCKPTSLDRVTLKRTGSKYKFRMHIWACV
GeneBank 661	TSISINFTTTEHQHVDQSDQLDSSGMFHWCKPTSLDRVTLKRTGSKYKFRMHIWACV	Armada 721	FDGASAPMLNFMVPIFNSTTRKELKIDVIFGCLDYLQREWRFFQFIYILPGCA
Armada 721	FDGASAPMLNFMVPIFNSTTRKELKIDVIFGCLDYLQREWRFFQFIYILPGCA	GeneBank 721	FDGASAPMLNFMVPIFNSTTRKELKIDVIFGCLDYLQREWRFFQFIYILPGCA
GeneBank 721	FDGASAPMLNFMVPIFNSTTRKELKIDVIFGCLDYLQREWRFFQFIYILPGCA	Armada 781	LYSGDHAANIQQCCMCAVLSFPFQSSNQVLVTEAMATLITGSLQDSSDPSFVSV
Armada 781	LYSGDHAANIQQCCMCAVLSFPFQSSNQVLVTEAMATLITGSLQDSSDPSFVSV	GeneBank 781	LYSGDHAANIQQCCMCAVLSFPFQSSNQVLVTEAMATLITGSLQDSSDPSFVSV
GeneBank 781	LYSGDHAANIQQCCMCAVLSFPFQSSNQVLVTEAMATLITGSLQDSSDPSFVSV	Armada 841	ESTPYGYNHNKSNKRVPLITELKNPSNHFEIQGLGEGSLQETNHLHSTAFSTGV
Armada 841	ESTPYGYNHNKSNKRVPLITELKNPSNHFEIQGLGEGSLQETNHLHSTAFSTGV	GeneBank 841	ESTPYGYNHNKSNKRVPLITELKNPSNHFEIQGLGEGSLQETNHLHSTAFSTGV
GeneBank 841	ESTPYGYNHNKSNKRVPLITELKNPSNHFEIQGLGEGSLQETNHLHSTAFSTGV	Armada 901	FSGSFLDLSLATAFYNNHIVLELQMLVYGGVSSQLQHLQDKRKYVADSCSTLSGRRR
Armada 901	FSGSFLDLSLATAFYNNHIVLELQMLVYGGVSSQLQHLQDKRKYVADSCSTLSGRRR	GeneBank 901	FSGSFLDLSLATAFYNNHIVLELQMLVYGGVSSQLQHLQDKRKYVADSCSTLSGRRR
GeneBank 901	FSGSFLDLSLATAFYNNHIVLELQMLVYGGVSSQLQHLQDKRKYVADSCSTLSGRRR	Armada 961	CKGLLESLHETLSLSDVNRFTFGQLFCGLSDLPGLIIVCLVYRIIDREELNPNKRVFTR
Armada 961	CKGLLESLHETLSLSDVNRFTFGQLFCGLSDLPGLIIVCLVYRIIDREELNPNKRVFTR	GeneBank 961	CKGLLESLHETLSLSDVNRFTFGQLFCGLSDLPGLIIVCLVYRIIDREELNPNKRVFTR
GeneBank 961	CKGLLESLHETLSLSDVNRFTFGQLFCGLSDLPGLIIVCLVYRIIDREELNPNKRVFTR	Armada 1021	PANFKELLDIVLFCALFFSTACYKNEEFLQKSYVEINVASQTTETHSDNCFPTIDS
Armada 1021	PANFKELLDIVLFCALFFSTACYKNEEFLQKSYVEINVASQTTETHSDNCFPTIDS	GeneBank 1021	PANFKELLDIVLFCALFFSTACYKNEEFLQKSYVEINVASQTTETHSDNCFPTIDS
GeneBank 1021	PANFKELLDIVLFCALFFSTACYKNEEFLQKSYVEINVASQTTETHSDNCFPTIDS	Armada 1081	VHETLSPVYVQPTNLSLFFQIADNQSRTNIISSQIFLGNANERKSTSDIWDYE
Armada 1081	VHETLSPVYVQPTNLSLFFQIADNQSRTNIISSQIFLGNANERKSTSDIWDYE	GeneBank 1081	VHETLSPVYVQPTNLSLFFQIADNQSRTNIISSQIFLGNANERKSTSDIWDYE
GeneBank 1081	VHETLSPVYVQPTNLSLFFQIADNQSRTNIISSQIFLGNANERKSTSDIWDYE	Armada 1141	DFEAYSEPL 1149
Armada 1141	DFEAYSEPL 1149	GeneBank 1141	DFEAYSEPL 1149
GeneBank 1141	DFEAYSEPL 1149	Armada 1081	HAESEHIDYVDDTGERQWQHHSRVVPLDTLDSADIVQEK 1121
Armada 1081	HAESEHIDYVDDTGERQWQHHSRVVPLDTLDSADIVQEK 1121	GeneBank 1081	HAESEHIDYVDDTGERQWQHHSRVVPLDTLDSADIVQEK 1121
GeneBank 1081	HAESEHIDYVDDTGERQWQHHSRVVPLDTLDSADIVQEK 1121		

Figura 17: Secuencias de aminoácidos de los canales Slo3 en el vector pcDNA 3.1 (-).

Alineamientos entre los canales hSlo3 (izquierda) y mSlo3 (derecha) subclonados en el vector pcDNA 3.1 (-) y sus respectivas secuencias reportadas en GeneBank. El canal hSlo3 conserva las mutaciones R739K y W788R mientras que el canal mSlo3 mantiene 100 % de identidad.

8.3. Obtención de Anticuerpo α Slo3 e inmunolocalización de los canales Slo3.

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos del presente proyecto era desarrollar un anticuerpo específico contra el canal Slo3 para utilizarlo como una herramienta que nos permitiera detectar a la proteína y tratar de determinar su distribución en el gameto masculino. Para cumplir con este punto, seleccionamos una secuencia peptídica de 17 aminoácidos (a.a.) específica de los canales Slo3. Esta secuencia se localiza al final del segundo dominio de modulación de la conductancia de K^+ (RCK2) del canal Slo3. La secuencia peptídica específica inmunogénica empleada comprende de una región que inicia en la Prolina 860(P860) y termina en la Glutamina 876 (Q876) del canal hSlo3. En el caso del canal de ratón, esta secuencia abarca de la Prolina 865 (P865) a la Glutamina 881 (Q881). En la **Figura 18** se muestra la secuencia peptídica seleccionada y el alineamiento de esta secuencia peptídica contra las secuencias proteicas reportadas en la base de datos (Uniprot). Los resultados de este análisis sugieren que la secuencia peptídica elegida para generar el anticuerpo específico contra el canal Slo3 reconoce únicamente a canales Slo3 de diferentes especies.

La inmunogenización de dos aves con el péptido antigénico seleccionado produjo dos anticuerpos denominados α Slo3 U1493 y α Slo3 U1504. En colaboración con la M. En C. Alejandra Solís López, se probaron ambos anticuerpos con diferentes condiciones experimentales tanto en células nativas (espermatozoides de humano y ratón) como en células CHO y se consideró que el anticuerpo con mayor especificidad para los canales hSlo3 y mSlo3 fue el anticuerpo α Slo3 U1493 con una dilución 1:1000 y utilizando gelatina como el bloqueador más eficiente.

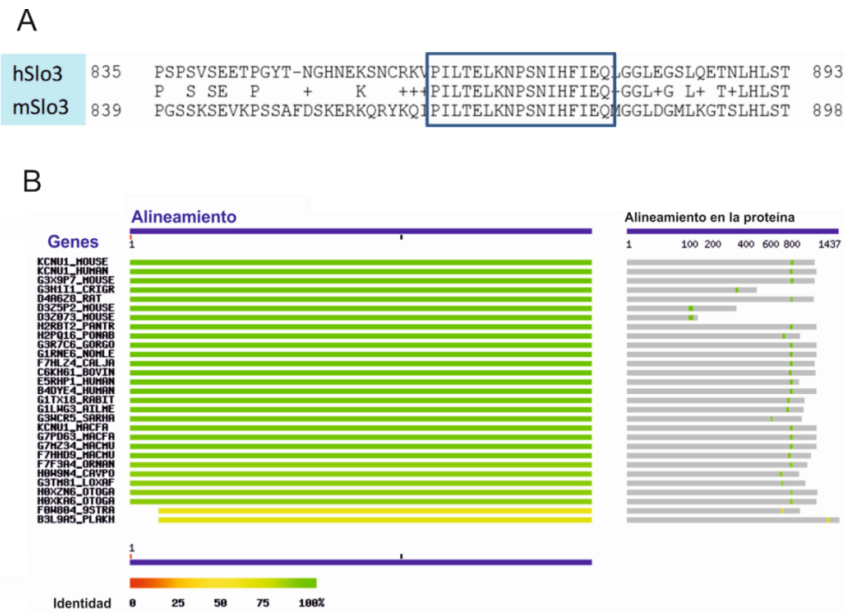


Figura 18: La secuencia peptídica seleccionada es específica de los canales Slo3.

A se muestra un alineamiento a nivel aminoácido de los canales hSlo3 y mSlo3 del aminoácido 835 al 893 y del 839 al 898, respectivamente. En el recuadro azul se encierra la secuencia que comparten ambos canales y que comprende desde la Prolina 860 (P860) hasta la Glutamina 876 (Q876) para el canal hSlo3, y desde la Prolina 865 (P865) hasta la Glutamina 881 (Q881) para el mSlo3. **B, izquierda,** alineamiento entre la secuencia peptídica específica de los canales Slo3 y distintas secuencia de las proteínas Slo3 en diferentes especies de mamíferos reportadas en la base de datos de <http://www.uniprot.org/>. El porcentaje de identidad entre la secuencia peptídica seleccionada contra las proteínas codificadas por los genes mostrados se reporta con un código de colores, donde los colores fríos cercanos al verde representan un porcentaje alto de identidad mientras que los colores cálidos señalan una identidad baja. Como puede observarse en el panel **B,** la secuencia antigénica sugerida en este trabajo presenta una alta identidad con los canales Slo3 de diferentes especies (las barras verdes representan 100 % de identidad). Las barras amarillas representan un bajo porcentaje de identidad entre canales de K^+ de diferentes especies que no pertenecen a la familia de los canales Slo3. *Derecha,* los alineamientos en gris muestran la longitud en aminoácidos de las proteínas y las franjas en color indican las regiones en donde el péptido seleccionado tiene identidad con la proteína en cuestión.

Con las condiciones experimentales antes mencionados, se realizaron los experimentos de inmunolocalización del canal Slo3 en las células CHO expresando la construcción que codifica para los canales mSlo3 o hSlo3, y en espermatozoides de ratón y humano.

8.3.1. Inmunolocalización en células CHO

Después de transfectar a las células CHO con las construcciones hSlo3–pcDNA 3.1 (-) o mSlo3–pcDNA 3.1 (-), se utilizaron cultivos con 72 h *post* transfección y se realizaron los ensayos de inmunocitoquímica.

Como primera prueba incubamos a las células CHO sin transfectar con el anticuerpo primario α Slo3 U1493 con la finalidad de descartar el reconocimiento inespecífico de alguna proteína endógena de esta línea celular (Control Ab 1°, primera fila de la **Figura 19**). De igual manera incubamos a las células CHO sin transfectar con la muestra preimmune (Control Preimmune) y sólo con Anticuerpo 2° (Control Ab 2°) para descartar que hubiera señal inespecífica endógena de las células CHO. En la **Figura 19** se puede observar que en los ensayos de inmunocitoquímica, en las tres condiciones anteriormente descritas, no hay señal endógena en las células CHO sin transfectar.

Por otro lado, como se puede ver en los tres paneles de la primera fila de la **Figura 20**, el anticuerpo α Slo3 U1493 no reconoció a ninguna proteína endógena presente en las células CHO (Control, Ab 1°). Sin embargo, en las células CHO transfectadas con el canal hSlo3 el anticuerpo α Slo3 U1493 reconoce al canal expresado en estas células (hSlo3 Ab 1°). Como se puede observar en los paneles de la segunda fila de la **Figura 20**, la señal reportada con el anticuerpo nos sugiere que los canales sintetizados por las células se encuentran distribuidos entre la membrana de la célula (ver inserto en la columna de sobrelape de los canales hSlo3 Ab 1°) y en algún organelo interno el cual podría ser el retículo endoplasmático y/o complejo de Golgi. El reconocimiento de los canales hSlo3 en las células transfectadas es específico ya que en la incubación con la muestra preimmune (**Figura 20**, hSlo3 preimmune) o sólo con el anticuerpo secundario (**Figura 20**, hSlo3 Ab 2°) no se observó señal alguna.

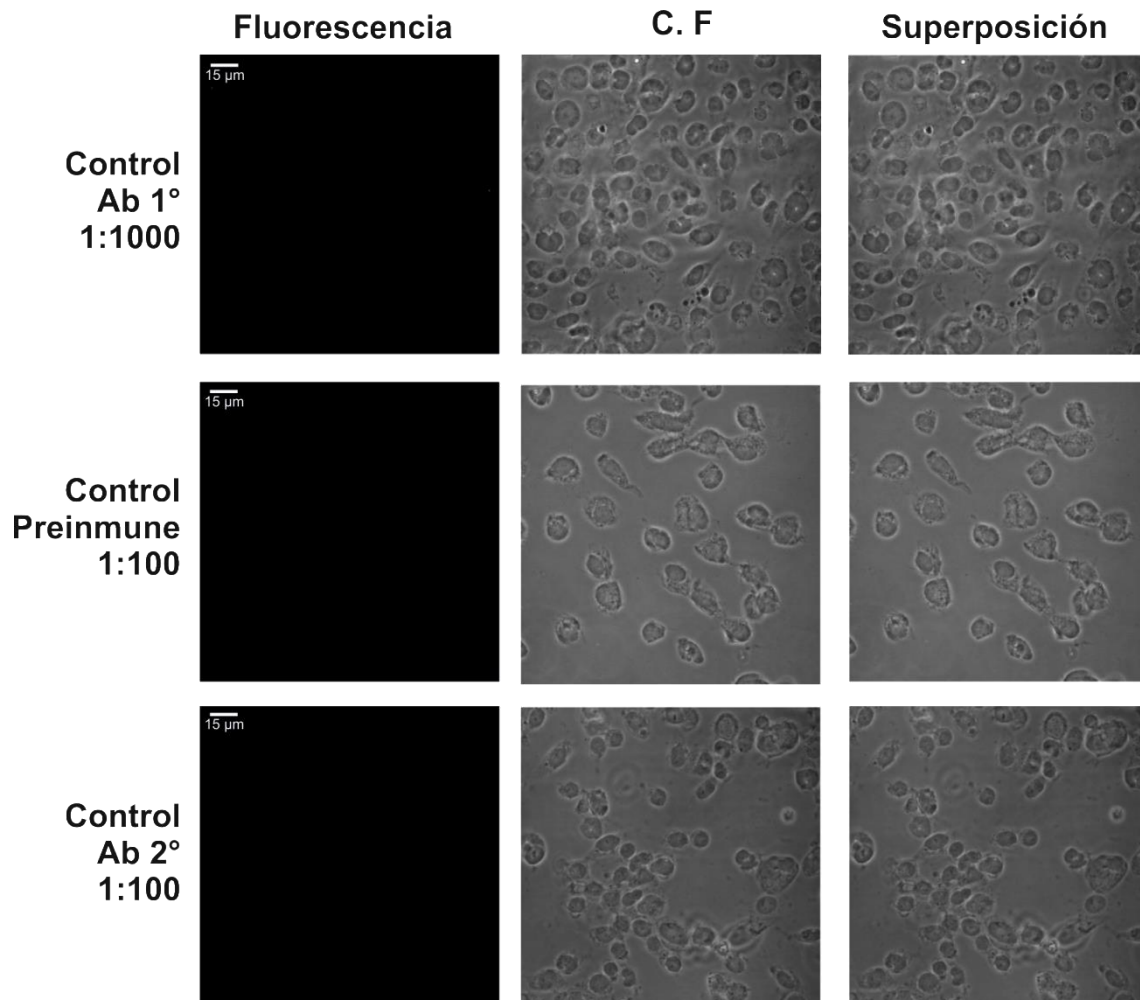


Figura 19: Las células CHO sin transfectar no expresan epítopes reconocidos por el Ab 1° U1493, el anticuerpo 2° o el suero preimmune.

Inmunocitoquímicas en células CHO control (sin transfectar) en diferentes condiciones experimentales: Ab 1° (1:1000), muestra preimmune (1:100) y sólo con Ab 2° (1:100). En ninguna de estas condiciones se observa fluorescencia, indicando que las células CHO no expresan epítopes endógenos para el anticuerpo U1493. Todas las muestras se incubaron con Ab 2° después de su tratamiento inicial, excepto el control Ab 2°. Micrografías tomadas con microscopio confocal. 40X. La barra de escala representa 15 µm. C.F (Contraste de Fases).

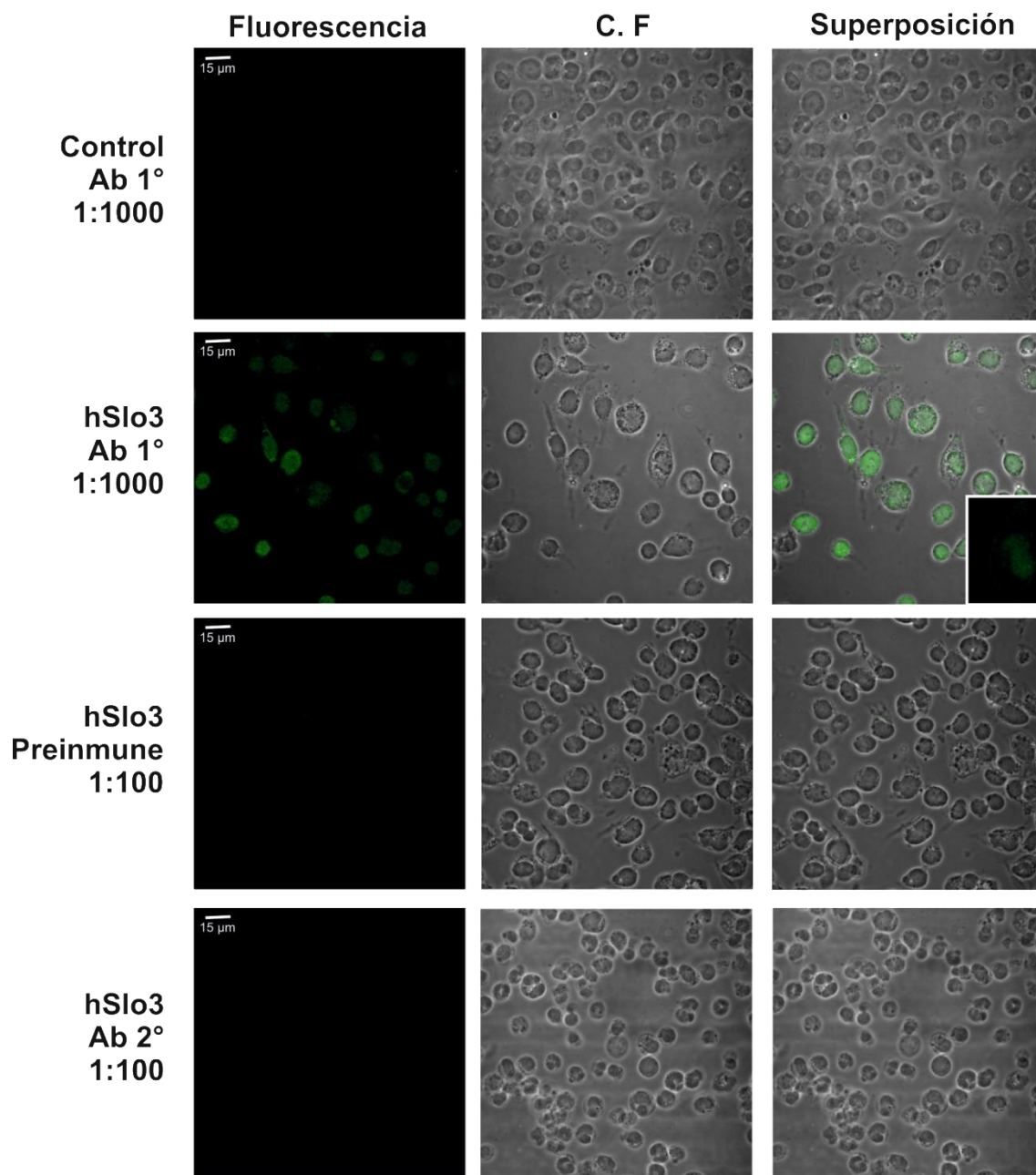


Figura 20: El canal hSlo3 se expresa en la membrana plasmática de las células CHO.

Control Ab 1°, las células CHO no transfectadas no presentan señal alguna al incubarse con el anticuerpo primario αSlo3 U1493. Por otra parte el uso del anticuerpo αSlo3 U1493 demostró que las células CHO transfectadas con la construcción hSlo3-pcDNA 3.1 (-) (hSlo3 Ab 1°) expresan al canal tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática (hSlo3 Ab 1°e inserto). La inmunodetección del canal hSlo3 por el anticuerpo es específica ya que células transfectadas e incubadas con la muestra preimmune (hSlo3 Preimmune) o sólo con el Ab 2° (hSlo3 Ab 2°) no mostraron señal alguna. Después de cada condición experimental ensayada, todas las muestras se incubaron con el Ab 2°. Micrografías tomadas con microscopio confocal. 40X. La barra de escala representa 15 μm. C.F (Contraste de Fases).

De manera similar, cuando transfectamos a las células CHO con la construcción mSlo3–pcDNA 3.1 (-), el anticuerpo α Slo3 U1493 reconoce al canal expresado en estas células (mSlo3 Ab 1°) (paneles de la segunda fila, **Figura 21**) Esta señal, al igual que la observada en células CHO transfectadas con hSlo3–pcDNA 3.1 (-), sugiere que los canales se están transcribiendo y traduciendo de manera exitosa, y que el canal mSlo3 se distribuye entre la membrana plasmática (inserto de mSlo3 Ab 1°, **Figura 21**) y en el interior de la célula. Como se puede observar en los paneles de la tercera fila de la **Figura 21**, cuando incubamos con la muestra preinmune a las células CHO transfectadas con mSlo3 (mSlo3 Preinmune) observamos una señal inespecífica, señal que no se observa en hSlo3 Preinmune (**Figura 20**) ni en Control Preinmune (**Figura 19**). En los paneles de la cuarta fila de la **Figura 21**, cuando se incuban las células CHO que expresan al canal mSlo3 con el Ab 2°, no se observa ninguna señal.

Nuestros resultados indican que ambos canales, hSlo3 y mSlo3, se expresan de manera exitosa en esta línea celular (**Figura 19 y 20**), y que la señal que observamos, por lo menos para las células CHO transfectadas con la construcción hSlo3–pcDNA 3.1 (-), incubadas con el anticuerpo primario α Slo3 U1493 son consecuencia del reconocimiento específico de los canales por este anticuerpo.

8.3.1. Inmunolocalización de los canales Slo3 endógenos del espermatozoide de ratón.

Como se mencionó anteriormente, la falta de anticuerpos específicos de buena calidad contra los canales Slo3 ha impedido determinar cuál es la distribución subcelular de estos canales en el gameto masculino. En el presente trabajo exploramos la distribución del canal endógeno en el espermatozoide utilizando los anticuerpos α Slo3 que desarrollamos en las secciones previas. La incubación de los espermatozoides de ratón no capacitados con el anticuerpo primario U1493 demostró

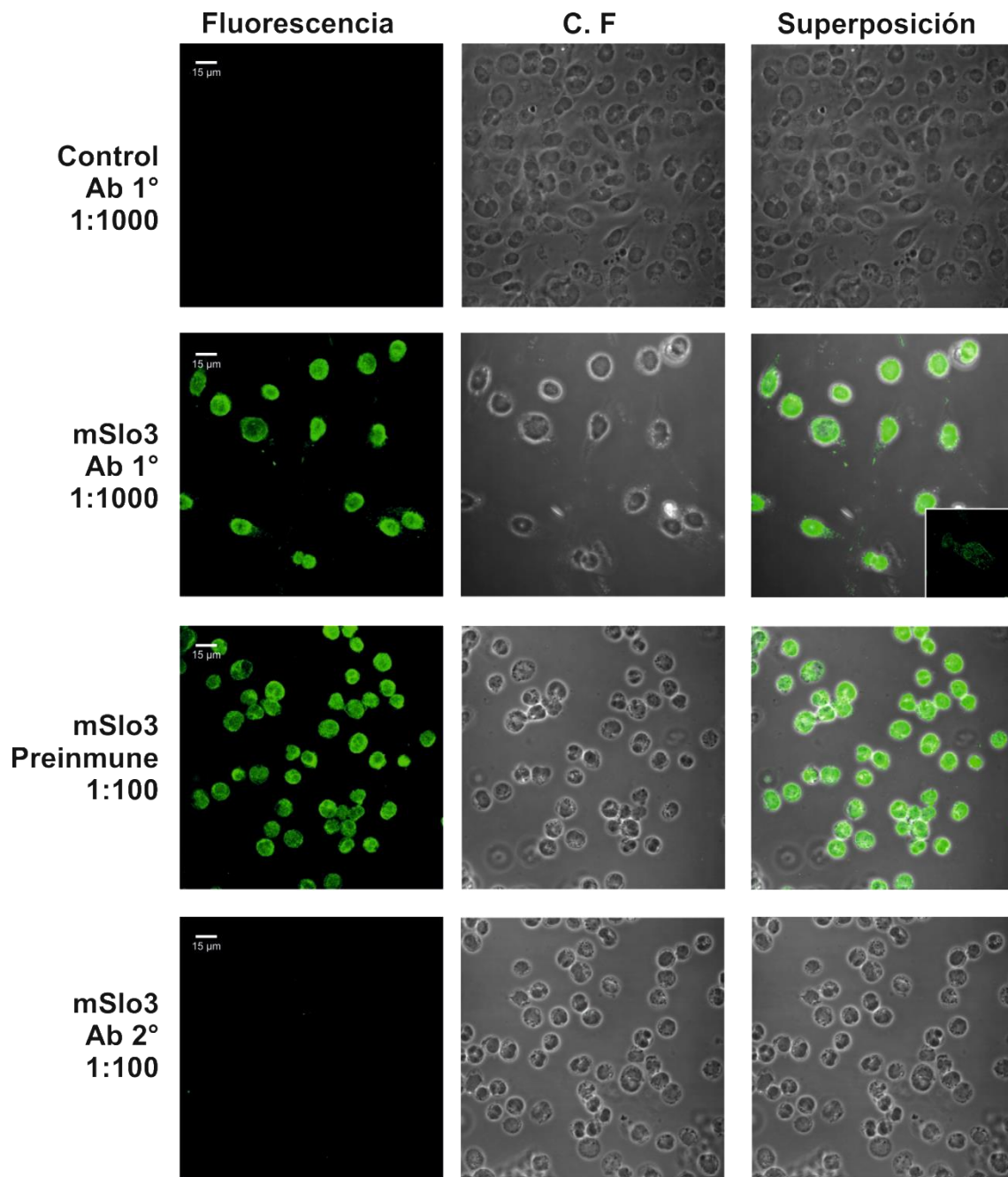


Figura 21: El canal mSlo3 se expresa en la membrana plasmática de las células CHO.

Control Ab 1°, las células CHO no transfectadas no presentan señal alguna al incubarse con el anticuerpo primario α Slo3 U1493. Por otra parte el uso del anticuerpo α Slo3 U1493 demostró que las células CHO transfectadas con las construcción mSlo3-pcDNA 3.1 (-) (mSlo3 Ab 1°) expresan al canal tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática (mSlo3 Ab 1° e inserto). Al incubar a las células CHO transfectadas con la construcción mSlo3-pcDNA 3.1 (-) con la muestra preimmune (mSlo3 Preimmune) se observa señal no específica en toda la célula, señal que no se observa en las células sin transfectar (**Figura 19**) ni en células transfectadas con la construcción hSlo3-pcDNA 3.1 (-) (**Figura 20**). Cuando incubamos a las células CHO transfectadas con mSlo3-pcDNA 3.1 (-) sólo con el Ab 2° (mSlo3 Ab 2°) no observamos señal alguna. Después de cada condición experimental ensayada, todas las muestras se incubaron con el Ab 2°. Micrografías tomadas con microscopio confocal. 40X. La barra de escala representa 15 μ m. C.F (Contraste de Fases).

que los canales Slo3 presentes en estas células se localizan principalmente en la región acrosomal de la cabeza y en las piezas media y principal del flagelo del espermatozoide del ratón. Esta regionalización de los canales contrasta con lo observado en la expresión transitoria del canal mSlo3 en células CHO, donde el canal se distribuye en toda la membrana celular y se acumula en organelos intracelulares probablemente como consecuencia de la alta expresión inducida por el promotor fuerte del plásmido utilizado como vector. Consistentemente, la señal reportada por el anticuerpo primario U1493 en el espermatozoide de ratón es específica ya que la incubación de los espermatozoides con la muestra preinmune o sólo con el anticuerpo 2° no muestra señal alguna (**Figura 22**).

8.1. Demostración de la expresión funcional de los canales Slo3 por determinación del potencial de reposo en las células CHO.

Las células CHO, se consideran un modelo muy ventajoso para el estudio de canales iónicos debido a su baja expresión de canales endógenos. En particular, se sabe que esta línea celular expresa muy pocos canales de K^+ por lo que se considera un excelente modelo para el estudio de canales de este tipo [46]. Como consecuencia de esta baja expresión de canales de K^+ , las células CHO tienen un potencial de membrana en reposo ($E_{m_{rep}}$) relativamente depolarizado en comparación con otras células. El $E_{m_{rep}}$ reportado para esta línea celular es de -30 mV de acuerdo a estudios previos [46].

Para corroborar esta información, el primer paso fue medir el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO sin transfectar por fluorimetría. Para ese estudio, se utilizó el colorante DisBAC₂ (3) o *bis*-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) el cual es un colorante oxonol cuya partición extra e intracelular es resultado del potencial de membrana de las células.

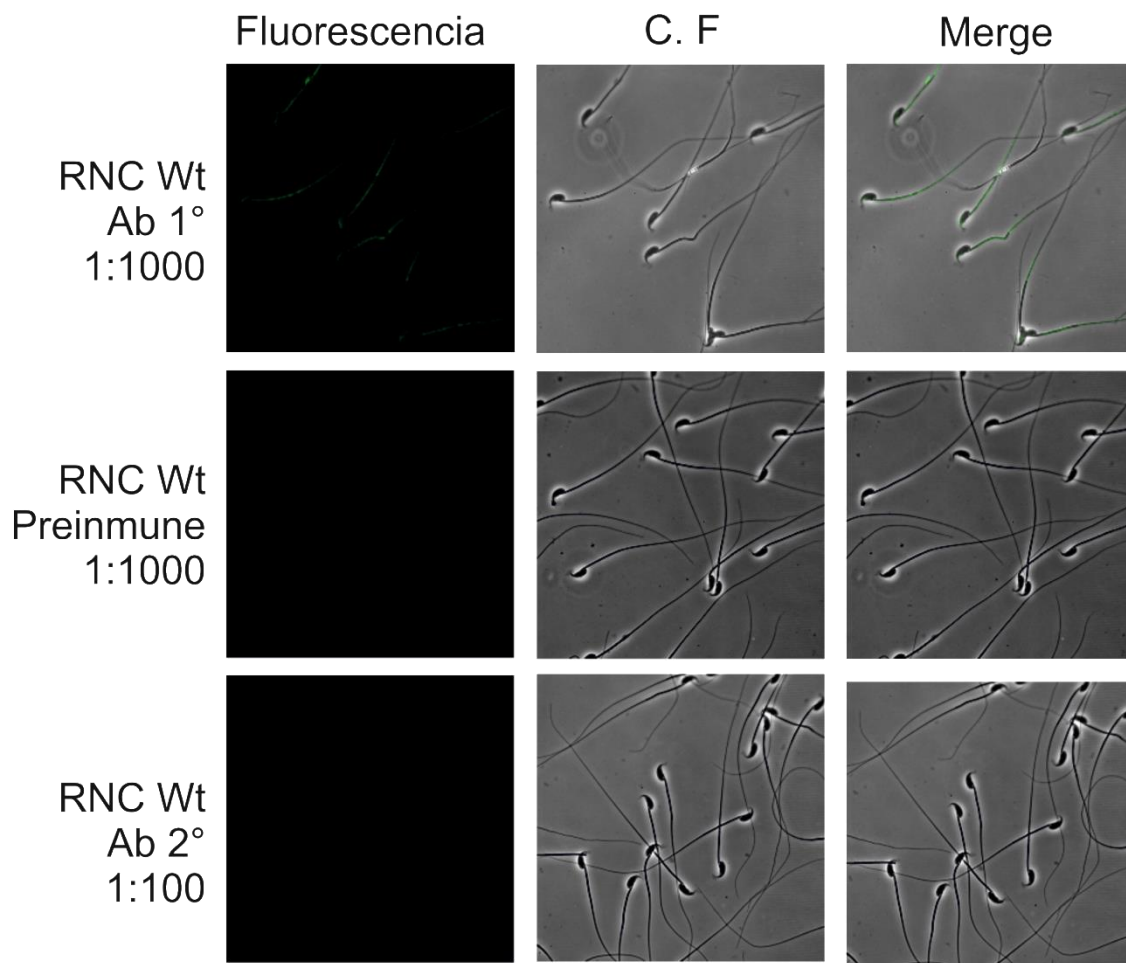


Figura 22: El canal Slo3 se localiza en la región acrosomal de la cabeza y en las piezas media y principal del flagelo del espermatozoide de ratón.

Inmunocitoquímicas en espermatozoides de ratón no capacitados (RNC Wt) en diferentes condiciones: células incubadas con Ab 1° (1:1000), con muestra preimmune (1:100) y sólo con Ab 2° (1:100). Todas las muestras se incubaron con Ab 2° después de su tratamiento inicial, excepto RNC Wt Ab 2°. En RNC Wt Ab 1° se puede observar que los canales Slo3 se localizan principalmente en la región acrosomal de la cabeza y en las piezas media y principal del flagelo de espermatozoides de ratón. Los espermatozoides no capacitados incubados con la muestra preimmune y sólo con Ab 2° no dan señal de fluorescencia. Micrografías tomadas con microscopio confocal. 40X. C.F (Contraste de Fases), MERGE (Superposición).

Cuando DisBAC₂ (3) se mueve de una solución acuosa extracelular hacia un ambiente de membrana no polar, su eficiencia cuántica aumenta (de 10 a 15 veces). La depolarización del potencial de membrana induce una transferencia adicional del colorante hacia las membranas, incrementando la señal de fluorescencia [47].

Como se describe en Materiales y Métodos, las adiciones de KCl depolarizan el potencial de membrana de las células CHO. Las células se trataron previamente con Gramicidina, un pentadecapéptido capaz de formar canales iónicos selectivos a cationes monovalentes, entre ellos al K^+ . Nuestra hipótesis fue que a medida que adicionáramos KCl, la fluorescencia aumentaría debido a la depolarización de las células.

Como se observa en la **Figura 23**, el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO sin transfectar (Ctl) fue de -26.0 ± 6.5 mV, potencial relativamente depolarizado tal y como lo reportan Gamper y colaboradores (2005) [46]. Para descartar que el vector pcDNA 3.1 (-) por sí mismo tuviera un efecto en el $E_{m_{rep}}$, transfectamos a las células con el vector vacío. El valor del $E_{m_{rep}}$ determinado para este caso fue -26.0 ± 9.8 mV, lo que descarta cualquier efecto no específico del vector sobre el $E_{m_{rep}}$ de las células transfectadas. A continuación determinamos el $E_{m_{rep}}$ de las células transfectadas con las construcciones hSlo3–pcDNA 3.1 (-) o mSlo3–pcDNA 3.1 (-) con la hipótesis de que los canales Slo3 funcionales hiperpolarizarían dicho potencial. La medición del $E_{m_{rep}}$ de las células transfectadas con hSlo3 o mSlo3, arrojó valores de -63.0 ± 6.0 mV y -62.4 ± 4.4 mV, respectivamente, lo que sugería, una expresión funcional de los canales Slo3 transfectados.

Como hasta la fecha no se cuenta con un inhibidor específico para canales Slo3, decidimos utilizar algunos bloqueadores inespecíficos, que sabemos, inhiben a los canales Slo3, para demostrar que el cambio de $E_{m_{rep}}$ observado en las células transfectadas se debía a la expresión de los mismos.

El Ba^{2+} es un ión divalente que tiene un radio que le permite ajustarse al tamaño del filtro de selectividad de los canales de potasio. Además su carga favorece que se una con alta afinidad a los canales de K^+ , de tal forma que previene el flujo rápido de K^+ [48]. Por estas razones decidimos probar este bloqueador como una primera

aproximación para determinar si los cambios observados en el $E_{m_{rep}}$ se debían a la expresión de Slo3. Por otro lado, en 2010, Tang y colaboradores probaron algunos inhibidores para los canales Slo1 y Slo3 [49], uno de esos inhibidores fue TEA. Sus estudios por electrofisiología demuestran que TEA aplicado de manera extracelular a una concentración de 10 mM bloquea parcialmente las corrientes de mSlo3 expresado heterológamente en ovocitos de *X. laevis*. Así, el uso de TEA (10 mM) y Ba^{2+} (1 mM) nos daría un perfil farmacológico que podríamos contrastar contra lo reportado anteriormente para el bloqueo del canal Slo3, y determinar si se bloqueaba o no la hiperpolarización inducida por esos canales en las células CHO transfectadas.

La hiperpolarización del $E_{m_{rep}}$ de las células CHO transfectadas con los canales mSlo3 o hSlo3 se revirtió totalmente al incubarlas con 1mM de Ba^{2+} , -25.5 ± 12.9 mV y -31.1 ± 2.0 mV, respectivamente. Estos valores son estadísticamente similares a los registrados en las células no transfectadas o transfectadas con el vector vacío (**Figura 23**).

Al incubar a las células CHO transfectadas con el canal hSlo3 con TEA 10 mM observamos una reversión parcial de la hiperpolarización a -46 ± 6 mV, lo que indica que el TEA, a esta concentración, está inhibiendo parcialmente los cambios en el $E_{m_{rep}}$ de las CHO inducidos por la expresión del canal hSlo3.

8.1. Reversión de mutaciones A2216G y C2302T

Por último, como se mencionó anteriormente, el canal hSlo3 está poco estudiado y no se ha caracterizado electrofisiológicamente. Dado que las mutaciones A2216G y C2302T se encuentran en uno de los dominios RCK2 que podría estar involucrado potencialmente en la activación del canal por pH y voltaje, consideramos importante revertir las mutaciones A2216G y C2302T para descartar cualquier posible efecto de estos cambios en las propiedades biofísicas del canal.

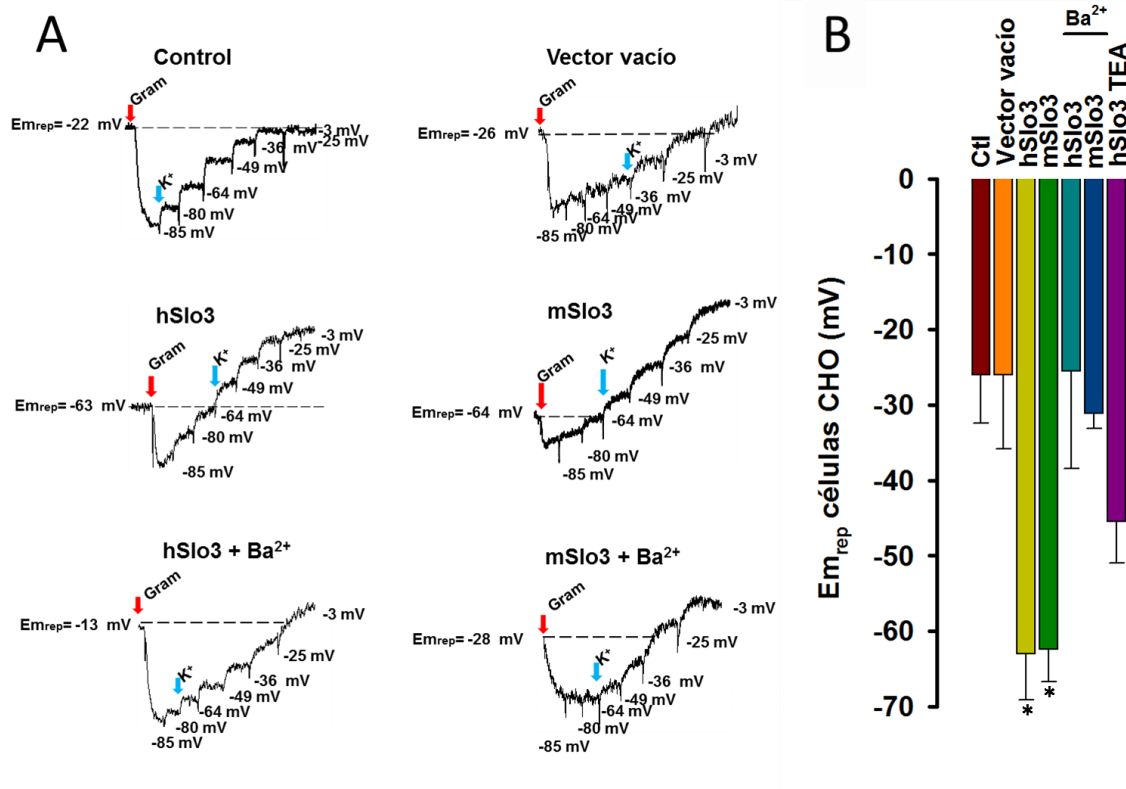


Figura 23: $E_{m_{rep}}$ de las células CHO.

A, Trazos representativos de los registros de potencial de membrana en reposo en diferentes condiciones experimentales, tanto las células sin transfectar (Control), como transfectadas con el vector pcDNA 3.1 (-) vacío y las construcciones hSlo3–pcDNA 3.1 (-) y mSlo3–pcDNA 3.1 (-) con Ba²⁺ 1 mM o TEA 10 mM tuvieron un $E_{m_{rep}}$ depolarizado a diferencia de las células transfectadas con los canales hSlo3 o mSlo3 que mostraron un potencial hiperpolarizado (~ -60 mV). La adición de Gramicidina (Gram) se muestra con una flecha roja; las adiciones de K⁺ se muestran con una flecha azul, y para cada trazo, por comodidad visual, sólo se muestra una adición. **B**, Promedios de los trazos descritos en el panel A. n = 3 -5. Los valores difieren significativamente según ANOVA, Prueba de Tukey. p > 0.001. milivolts (mV).

++

Para esto se realizaron mutaciones puntuales con la técnica de PCR. Se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia del canal que flanquea la mutación tanto en el sentido 5'–3' como en el sentido 3'–5' (ver en Materiales y Métodos); los oligos A2216G+ y A2216G se diseñaron para revertir la mutación A2216G, mientras que los oligos C2302T+ y C2302T se utilizaron para revertir la mutación C2302T.

Las primeras reacciones que se realizaron fueron las necesarias para revertir la mutación A2216G. Para esto se requirió la amplificación del fragmento 3 hSlo3–A2216G y del fragmento A2216G+–A hSlo3 (**Figura 24 A**), los cuales sirvieron como templado para amplificar el fragmento denominado Reversión de mutación A2216G (**Figura 24 B**).

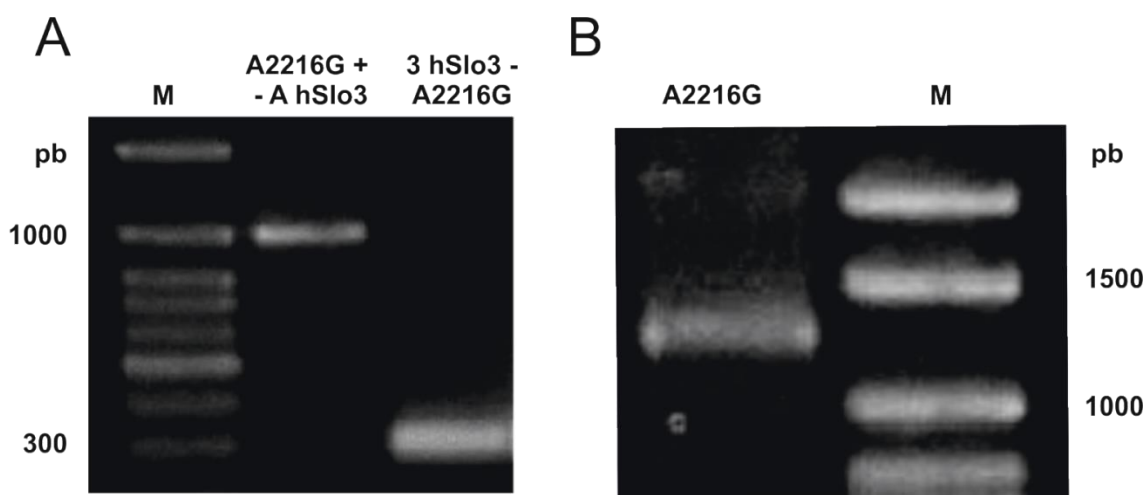


Figura 24: PCRs para revertir la mutación A2216G

A, Bandas correspondientes a los tamaños esperados de las reacciones A2216G+–OligoA hSlo3 y Oligo 3 hSlo3–A2216G (~1050 pb y ~350 pb, respectivamente). **B**, Banda correspondiente al tamaño esperado de la reacción Reversión de mutación A2216G, el tamaño esperado y observado fue de ~1300 pb. La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. pb, pares de bases.

Para determinar si el protocolo que estábamos llevando a cabo era exitoso y se generaba una mutación puntual, se secuenció el fragmento Reversión de mutación A2216. Los resultados de secuenciación indicaron que se llevó a cabo la reversión de la mutación A2216G cambiando a la Adenina 2216 mutada por una Guanina tal como aparece en la secuencia del canal hSlo3 reportada en GeneBank (**Figura 25**).

El siguiente paso fue la reversión de la mutación C2302T. Para eso fue necesario amplificar los fragmentos 3 hSlo3–C2302T y C2302T+–A hSlo3 (**Figura 26**) de tal forma que sirvieran como templado para la amplificación del fragmento Reversión de mutación A2216G y C2302T. Sin embargo éste último fragmento, pese a

diversas reacciones bajo múltiples condiciones, no se pudo obtener, por lo que se replanteó la estrategia de mutación puntual.



Figura 25: Secuencia armada de hSlo3 con reversión de la mutación A2216G.

Alineamiento entre la secuencia armada de hSlo3 y la secuencia obtenida del fragmento reversión mutación A2216G. El cuadro azul encierra la secuencia que corresponde a los oligos utilizados para las reacciones necesarias para la reversión de la mutación. En rojo se observa la sustitución de una Guanina (G) por una Adenina (A). Los números indican las pares de bases de cada una de las secuencias.

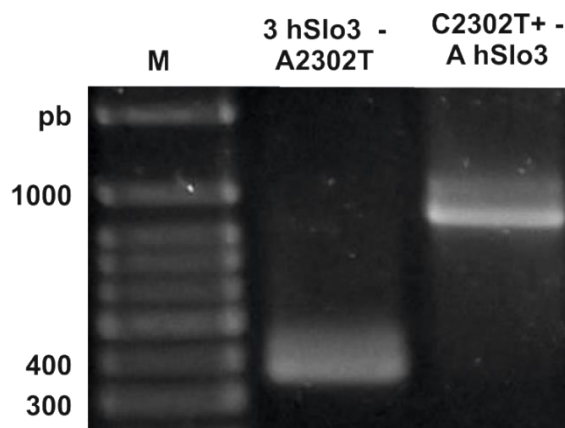


Figura 26: PCRs para revertir la mutación C2302T.

Bandas correspondientes a los tamaños esperados y observados para los fragmentos 3 hSlo3–A2304T y C2304T+-A hSlo3 (~420 pb y ~960 pb, respectivamente). La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. pb, pares de bases.

La nueva estrategia se planteó a partir de la obtención de un fragmento (A2216G+ – C2302T) que tuviera las dos sustituciones (A2216G y C2302T); y una vez obtenido ese fragmento, utilizarlo como oligonucleótido “gigante” para la amplificación de la clona completa del canal con las dos reversiones.

El tamaño esperado del fragmento A2216G+–C2302T fue de ~110 pb (**Figura 27**). Este oligo “gigante” fue utilizado para las reacciones de los fragmentos A2216G+-T7 y T3-C2302T (**Figura 28**), los cuales fueron utilizados como templados para la reacción del fragmento T3-T7 con reversiones A2216G y C2302T (**Figura 29**). Cuando se comprobó que el tamaño observado coincidía con el tamaño esperado, el siguiente paso fue la ligación de la clona que codifica para el canal hSlo3 con las reversiones A2216G y C2302T y el vector pOX.

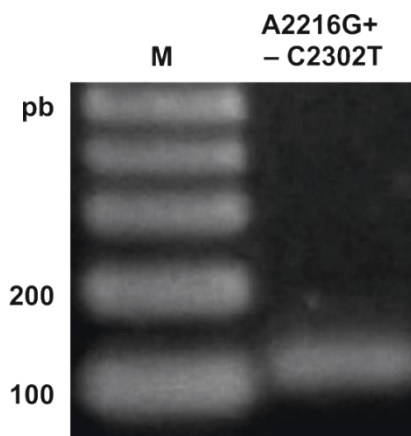


Figura 27: PCR para la obtención de A2216G+–C2302T.

La banda observada coincide con el tamaño en pb que se esperaba. La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. pb, pares de bases.

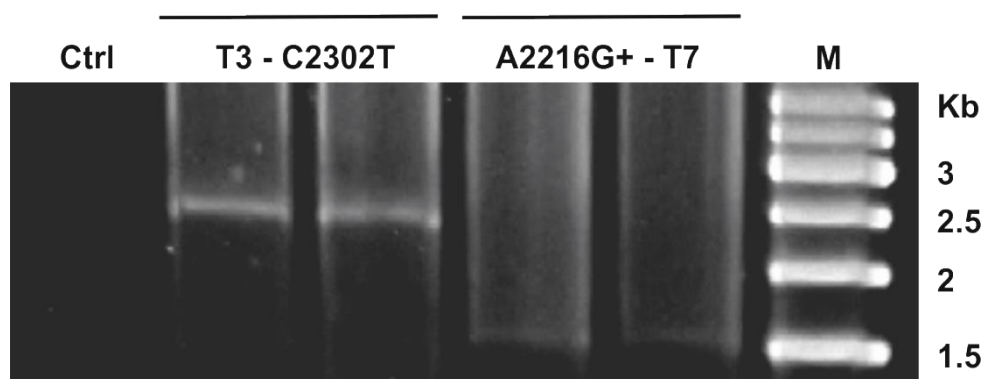


Figura 28: PCR para la obtención de A2216G+-T7 y T3-C2302T.

Las bandas observadas coinciden con los tamaños en pb que se esperaban, ~2.4 y ~1.5 Kb para T3–C2304T y T7–A2216G+, respectivamente. No se observa ninguna banda en la reacción control. La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Kb, Kilobases; ctrl, control.

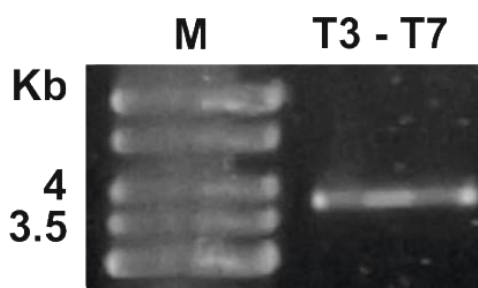


Figura 29: PCR para la obtención de las reversiones A2216G y C2302T.

La banda observada coincide con el tamaño en pb que se esperaba (3.9 Kb). La fotografía corresponde a las bandas observadas en un gel de agarosa 1 %. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Kb, Kilobases.

Sin embargo, hasta el momento no hemos encontrado las condiciones adecuadas para realizar la ligación del fragmento T3 – T7 por lo que no se obtuvieron colonias con la construcción esperada y no hemos podido confirmar la reversión de las mutaciones, por lo que se siguen ajustando las condiciones para realizar esta ligación.

9. Discusión

El desarrollo de herramientas moleculares para el estudio del canal de K^+ Slo3 es de gran importancia ya que los antecedentes nos sugieren que este canal es fundamental para que se lleve a cabo la fecundación en mamíferos. En el presente estudio se realizaron algunos avances que nos permitirán estudiar y comprender con mayor precisión cuál es la función que el Slo3 desempeña en la fisiología del espermatozoide de mamífero, y de manera más específica, en la reproducción humana.

Anteriormente se había demostrado que el canal Slo3 se expresa de manera exclusiva en tejido testicular de mamíferos [42] y que es un canal iónico que pertenece a la familia de los canales SLO al igual que los canales Slo1 y Slo [34]. A diferencia de los canales Slo1 y el Slo2, el Slo3 responde a cambios en el pH_i , produciendo corrientes de K^+ cuando el pH_i se alcaliniza y su selectividad al K^+ es menor que la de los otros dos miembros de la familia [42, 43, 48, 49]. Estas corrientes desaparecen en los ratones nulos para este canal, lo cual confirma que el canal Slo3 genera a las corrientes de K^+ sensibles a pH y demuestra cuál es el modo de activación del canal Slo3 en espermatozoides [24, 51]. De manera interesante, los espermatozoides de los ratones nulos para el canal Slo3 no presentan la hiperpolarización que ocurre durante la capacitación, además disminuye el porcentaje de espermatozoides con un nado progresivo y con capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal. Como consecuencia de este fenotipo, los espermatozoides de los ratones nulos son incapaces de fecundar al ovocito en estudios *in vitro* y son infértiles en estudios *in vivo* [24].

Todas estas observaciones en ratón llevan a especular sobre la importancia que tiene el canal Slo3 en la fisiología del espermatozoide humano. Recientemente se publicó la estructura cristalográfica del canal hSlo3 [53] y junto con una serie de experimentos se demostró que, al igual que el mSlo3, el hSlo3 expresado de forma heteróloga en ovocitos de *X. laevis*, es sensible al aumento de pH.

De acuerdo con reportes anteriores, no se había logrado expresar a los canales mSlo3 y hSlo3 de forma heteróloga en una línea celular de mamífero. En este trabajo logramos subclonar a los canales mSlo3 y hSlo3 en un vector de expresión para células de mamífero, estableciendo y realizando la expresión transitoria de los mismos en células CHO. Consideramos que la expresión heteróloga transitoria de los canales Slo3 en una línea celular de mamíferos nos permitirá realizar estudios que arrojen resultados más próximos del comportamiento de los canales mSlo3 y hSlo3 en un entorno celular más cercano a la membrana del espermatozoide.

A pesar del poco conocimiento acerca de la regulación de los canales Slo3 por subunidades accesorias, estudios previos han demostrado que las subunidades $\beta 4$ y LRRC52 están enriquecidas en el tejido testicular y son indispensables para la expresión de la proteína en la membrana plasmática y para la regulación de las propiedades biofísicas del canal en sistemas heterólogos [53–55]. Es altamente probable que en las células nativas, la subunidad $\beta 4$ y/o LRRC52 participen activamente en la expresión membranar del canal Slo3. En la bibliografía consultada no hay reportes donde indiquen si estas subunidades se expresan en las células CHO. En 1996, con la técnica de Northern blot, se identificó al transcrito que codifica para subunidad $\beta 2.1$ en las células CHO [56], subunidad que a pesar de interaccionar con mSlo3, no influye en el aumento de expresión membranar del canal en ovocitos de *X. laevis*. [55]. Sería interesante inspeccionar si en las células CHO se expresan otras subunidades accesorias de manera endógena que pudieran estar interaccionando con los canales Slo3 y contribuir en la expresión del canal en esta línea celular. A pesar de

este desconocimiento, nuestros resultados de inmunocitoquímica y determinación del potencial de reposo indican que obtuvimos un buen nivel de expresión de los canales en el modelo celular utilizado. Por inmunocitoquímica pudimos ver que nuestro nivel de expresión fue cercano al 95 % del total de las células 72 h post transfección (hSlo3 Ab 1° y mSlo3 Ab 1°, **Figuras 20 y 21**, respectivamente). Como lo demuestran nuestros ensayos de inmunocitoquímica en las células CHO, al observar cortes ópticos de las células por el microscopio confocal pudimos observar una buena expresión de canales Slo3, localizándose en el citoplasma, posiblemente en el retículo endoplasmático, y en la membrana plasmática. Para el canal mSlo3 se ha demostrado la importancia de algunas subunidades accesorias para el traslado del canal a la membrana [55] La alta retención del canal en el citoplasma podría deberse a que las subunidades accesorias endógenas de las células CHO son insuficientes y/o interaccionan débilmente con la subunidad α formadora del poro del Slo3. Esta baja interacción de las subunidades accesorias y la alta expresión del canal Slo3 como consecuencia del promotor fuerte (CMV) utilizado ocasionarían una alta retención citoplasmática del canal. Sin embargo, los canales Slo3 presentes en la membrana celular (insertos hSlo3 Ab 1° y mSlo3 Ab 1°, **Figuras 20 y 21**, respectivamente), fueron suficientes para influir en el potencial de reposo de esta línea celular.

Con respecto a la inmunolocalización del canal mSlo3 en espermatozoide de ratón, la detección del canal con el anticuerpo α Slo3 U1493 se observa en la punta de la región acrosomal, y mayoritariamente en la pieza media y pieza principal del flagelo. Estas observaciones coinciden, en parte, con los registros electrofisiológicos del canal Slo3 realizados en espermatozoides de ratón. En 2007, Navarro y colaboradores realizaron experimentos en espermatozoides fragmentados de ratón. Ellos dividieron a los espermatozoides en dos regiones que tenían la capacidad de resellar su membrana, fragmentos de cabeza + pieza media o fragmentos de pieza media + pieza principal. Con estos fragmentos realizaron experimentos electrofisiológicos y

demonstraron que sólo podían registrar corrientes macroscópicas de K^+ sensibles a pH en el fragmento que comprendía a las piezas media y principal pero no en los fragmentos de cabeza + pieza media, concluyendo que esas corrientes sólo se originan en la pieza principal [43]. A pesar de esas observaciones, nosotros, además de detectar a los canales Slo3 en la pieza principal, también observamos señal del anticuerpo en la punta de la región acrosomal y en la pieza media. Una posible explicación de esta discrepancia con nuestros resultados podrían sugerir que en la cabeza y en la pieza media existe una menor cantidad de canales Slo3 y es posible que esta baja densidad de canales no permitió a Navarro y colaboradores registrar corrientes macroscópicas en esas regiones, pero no podemos descartar la presencia de corrientes microscópicas.

Con el antecedente de que el ratón nulo para el canal Slo3 no presenta la hiperpolarización característica de la capacitación, una de las conclusiones es que esta entidad molecular participa activamente en la modulación del cambio de potencial en la membrana de los espermatozoides durante la capacitación. Con los ensayos de fluorimetría, pudimos demostrar que los canales Slo3 hiperpolarizan el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO transfectadas a pH 7.4, valor que está dentro del rango de activación de los canales Slo3 de acuerdo a trabajos previos [42, 48, 49, 51, 52]. Leonetti y colaboradores (2012) reportaron la dependencia de pH de los canales hSlo3 y mSlo3 expresados en ovocitos de *X. laevis* [53]. En ambos casos, ellos obtienen corrientes máximas a un pH alcalino ($pH \geq 8.5$). Sin embargo, a pH 7.4 observan ~ 25 % de activación de la corriente de los canales Slo3 aún en ausencia de la subunidad accesoria LRRC52. Estos datos sugieren que los canales Slo3 transfectados en las células CHO están activos al pH que llevamos a cabo nuestros experimentos de fluorimetría; y dado que las células CHO no expresan endógenamente una cantidad alta de canales de K^+ , los canales Slo3 expresados en la membrana plasmática serían suficiente para hiperpolarizar el potencial de reposo. Esto es posible porque los

canales de K^+ generan corrientes salientes que hiperpolarizan el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO, acercando el potencial de las células al potencial de equilibrio del K^+ . Este resultado refuerza la hipótesis de que el Slo3 influye en la hiperpolarización del potencial de reposo de las células donde se expresan.

Los ensayos de fluorometría con bloqueadores de canales de K^+ como Ba^{2+} o TEA, nos dieron más evidencia de que el cambio en el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO transfectadas con la construcción que codifica para los canales Slo3, se debe a la expresión de canales de K^+ . Al incubar a las células con 1 mM de Ba^{2+} el $E_{m_{rep}}$ se revierte a un valor cercano al de las células CHO sin transfectar, y al incubar con 10 mM de TEA el valor del $E_{m_{rep}}$ se reduce a valores distintos a las células transfectadas sin tratamiento. Estos resultados indican que el canal hSlo3, al igual que el canal mSlo3 se bloquea o disminuye su actividad por los mismos inhibidores a esas concentraciones.

Recientemente, en el laboratorio se han detectado corrientes de K^+ en células CHO transfectadas con la construcción pcDNA3.1-hSlo3 con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (en inglés, “patch- clamp”) (datos no mostrados). Estas corrientes están ausentes en células CHO sin transfectar, confirmando que, evidentemente, las células CHO sin transfectar no expresan corrientes macroscópicas de K^+ y que las corrientes producidas al transfectarlas con la construcción pcDNA3.1-hSlo3 se deben a la actividad de esta entidad molecular. Estos resultados, junto con los realizados en el fluorómetro demuestran que el canal Slo3 se expresa de manera exitosa y que es funcional en nuestro sistema heterólogo.

Por otro lado, la L. en C. Paulina Torres, utilizando la técnica de citometría de flujo, demostró que en espermatozoides de humano existe una subpoblación de células que se hiperpolarizan durante el proceso de capacitación (datos sin publicar). Con la hipótesis de que esa hiperpolarización inducida durante la capacitación se debe

en gran medida a la participación del canal hSlo3, nos dimos a la tarea de realizar experimentos en el citómetro de flujo, incubando a los espermatozoides humano durante su tiempo de capacitación con bloqueadores de canales Slo3 tales como Clofilium (50 μ M), TEA (10 y 60 mM) y Ba²⁺ (1mM). Nuestros resultados preliminares indican que la subpoblación de espermatozoides que se hiperpolarizan después de la capacitación desaparece al incubar durante la capacitación a las células con los bloqueadores antes mencionados. El hecho de que el perfil farmacológico observado para los canales hSlo3 expresados en las células CHO sea igual al observado para el bloqueo de la hiperpolarización de los espermatozoides humanos capacitados refuerzan la hipótesis de la participación de los canales Slo3 de humano en la hiperpolarización del potencial de membrana observada durante la capacitación de los espermatozoides humanos y que el canal hSlo3 pudiera tener una participación fundamental en el proceso de la fecundación.

Si logramos comprobar que la hiperpolarización inducida por la capacitación en espermatozoides humanos es fundamental para la fecundación, y que esta hiperpolarización se debe principalmente a la participación del canal hSlo3, sería de gran interés analizar con mayor detalle factores que desencadenen la inactivación del canal, la pérdida de función y/o alteraciones en el canal hSlo3 o en subunidades regulatorias con la finalidad de desarrollar fármacos anticonceptivos que actúen por medio de la inhibición del canal y como consecuencia el proceso de fecundación.

10. Conclusiones

- Por patrones de digestión se logró confirmar la identidad y la integridad molecular de las clonas que codifican para los canales hSlo3 y mSlo3.
- Los resultados de secuenciación mostraron que nuestra clona que codifica para mSlo3 tuvo 100 % de identidad con la secuencia de mSlo3 que se reporta en GeneBank, mientras que nuestra clona que codifica para hSlo3 tuvo identidad de 99 % cuando se comparó con la secuencia que reporta GeneBank en su base de datos.
- La clona que codifica para hSlo3 tiene tres mutaciones a nivel nucleótido: C771T, A2216G y C2302T, de las cuales dos (A2216G y C2302T) no se conservan a nivel aminoácido, produciendo un cambio en la Arginina 739 por una Lisina (R739K) y un cambio en el Triptófano 788 por una Arginina (W788R), respectivamente.
- A partir de una secuencia compartida de 17 aminoácidos que corresponden al dominio citoplasmático del canal hSlo3 (Prolina 850 a la Glutamina 876) o del mSlo3 (Prolina 865 a la Glutamina 881) obtuvimos dos anticuerpos, el anticuerpo α Slo3 U1492 y el α Slo3 U1504 contra el canal Slo3.
- Subclonamos a los genes que codifican para los canales mSlo3 y hSlo3 en el vector de expresión pcDNA 3.1 (-) para expresión en células de mamífero.
- Por primera vez se logró expresar de forma heteróloga a estos canales en una línea celular de mamífero, las células CHO.

- La expresión de los canales mSlo3 y hSlo3 en células CHO se comprobó con ensayos de inmunocitoquímica, detectando señal en el citoplasma, posiblemente en complejo de Golgi y/o retículo endoplasmático, y en membrana plasmática.

- Además con los ensayos de inmunocitoquímica en espermatozoides de ratón, se observó la presencia del canal mSlo3 en la punta de la región acrosomal, en la pieza media y en la pieza principal.

- La funcionalidad de mSlo3 y hSlo3 expresados en células CHO se comprobó por fluorimetría. La expresión de los canales mSlo3 y hSlo3 inducen una hiperpolarización en el $E_{m_{rep}}$ de las células CHO transfectadas.

11. Perspectivas

- Encontrar las condiciones experimentales que nos permitan revertir por PRC las mutaciones A2216G y C2301T.

- Registrar las corrientes de hSlo3 expresado en células CHO con la técnica de “patch-clamp”.

- Coexpresar al canal hSlo3 y a las subunidades accesorias $\beta 4$ de humano (h $\beta 4$) y hLRRC52 (subunidades con las que contamos en el laboratorio) para determinar si la expresión de los canales hSlo3 en la membrana plasmática está regulada por estas subunidades y si las propiedades biofísicas se ven modificadas con la expresión de h $\beta 4$ y hLRRC52.

- La subunidad hLRR52 contiene repeticiones ricas de 20 – 29 residuos de leucinas, denominados LRRT, LRR1-6 y LRRC. Sería interesante saber qué dominios son fundamentales para la regulación del canal. Proponemos realizar construcciones que contengan al menos un dominio LRR, subclonaras en el vector de expresión pcDNA 3.1 (-) y realizar registros electrofisiológicos. De esta forma podríamos saber cuál o cuáles dominios interaccionan con la subunidad α del canal hSlo3 y cómo regulan sus propiedades biofísicas.

12. Apéndice

12.1. Amplificación del canal hSlo3 por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (construcción pOX-hSlo3)	~14 ng
Oligo F T3 (5' CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG 3')	0.5 μ M
Oligo R T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3')	0.5 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Alineamiento	55	20	
Elongación	72	80	
Elongación final	72	600	1

12.2. Amplificación del fragmento 3 hSlo3 – A2216G por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (hSlo3)	~10 ng
Oligo F – Oligo 3 hSlo3 (5' TAT ATC AGG GCA GGA TTC TCC 3')	0.3 μ M
Oligo R - A2216G (5' GGT ATA GTT GCT GGC TCT CAA GGG CAT TAC 3')	0.3 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	20	30
Alineamiento	60	20	
Elongación	72	20	
Elongación final	72	300	1

12.3. Amplificación del fragmento A2216G+ – A hSlo3 por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (hSlo3)	~50 ng
Oligo F – A2216G+ (5' GTA ATG CCC TTG AGA GCC AGC AAC TAT ACC 3')	0.3 µM
Oligo R - Oligo A hSlo3 (5' GTT GTC TGT GAT GCT TTA TTT ACA 3')	0.3 µM

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	20	30
Alineamiento	50	20	
Elongación	72	30	
Elongación final	72	300	1

12.4. Amplificación del fragmento Reversión de mutación A2216G por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Fragmento Oligo 3 hSlo3 – A2216G	~10 ng
Fragmento A2216G+ – Oligo A hSlo3	~10 ng
Oligo F – Oligo 3 hSlo3 (5' TAT ATC AGG GCA GGA TTC TCC 3')	0.3 μ M
Oligo R – Oligo A hSlo3 (5' GTT GTC TGT GAT GCT TTA TTT ACA 3')	0.3 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	180	1
Desnaturalización	95	30	30
Alineamiento	60	30	
Elongación	72	90	
Elongación final	72	600	1

12.5. Amplificación del fragmento 3 hSlo3 – C2302T por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Fragmento Reversión de mutación A2216G	~ 24 ng
Oligo F – Oligo 3 hSlo3 (5' TAT ATC AGG GCA GGA TTC TCC 3')	0.3 μ M
Oligo R – Oligo C2302T (5' GGG AAA ATT CCA GAG AAA TCG CCA TTC 3')	0.3 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	180	1
Desnaturalización	95	30	30
Alineamiento	65	30	
Elongación	72	30	
Elongación final	72	600	1

12.6. Amplificación del fragmento C2302T+ – A hSlo3 por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Fragmento Reversión de mutación A2216G	~ 24 ng
Oligo F – Oligo C2302T+ (5' GAA TGG CGA TTT CTC TGG AAT TTT CCC 3')	0.3 µM
Oligo R – Oligo A hSlo3 (5' GTT GTC TGT GAT GCT TTA TTT ACA 3')	0.3 µM

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	180	1
Desnaturalización	95	30	30
Alineamiento	65	30	
Elongación	72	60	
Elongación final	72	600	1

12.7. Amplificación del fragmento Reversión de mutación A2216G y C2302T por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final (μM)
Fragmento 3 hSlo3 – C2302T	0.1
Fragmento C2302T+ – A hSlo3	0.1
Oligo F – Oligo 3 hSlo3 (5' TAT ATC AGG GCA GGA TTC TCC 3')	0.3
Oligo R – Oligo A hSlo3 (5' GTT GTC TGT GAT GCT TTA TTT ACA 3')	0.3

Se utilizó el mismo programa y las condiciones de los ciclos de la amplificación del fragmento *Reversión de mutación A2216G*

12.8. Amplificación del fragmento A2216G+ – C2302T por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (construcción pOX-hSlo3)	~14 ng
Oligo F – Oligo A2216G+ (5' GTA ATG CCC TTG AGA GCC AGC AAC TAT ACC 3')	0.3 μM
Oligo R – Oligo C2302T (5' GGG AAA ATT CCA GAG AAA TCG CCA TTC 3')	0.3 μM

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	180	1
Desnaturalización	95	30	30
Alineamiento	65	30	
Elongación	72	20	
Elongación final	72	600	1

12.9. Amplificación del fragmento T3 - C2302T por PCR.

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (hSlo3)	~10 ng
Fragmento A2216G+ - C2307T	~10 ng
Oligo F T3 (5' CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG 3')	0.5 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Alineamiento	55	20	
Elongación	72	50	
Elongación final	72	600	1

12.10. Amplificación del fragmento A2216G+ - T7 por PCR

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
Templado (hSlo3)	~10 ng
Fragmento A2216G+ - C2302T	~10 ng
Oligo R T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3')	0.5 μ M

Se utilizó el mismo programa y las condiciones de los ciclos de la amplificación del fragmento T3 - C2302T.

12.11. Amplificación del fragmento T3 - T7 con reversiones A2216G y C2302T por PCR

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final (μM)
Fragmento T3 - C2302T	0.3
Fragmento A2216G+ - T7	0.3
Oligo F T3 (5' CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG 3')	0.5
Oligo R T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3')	0.5

Se utilizó el mismo programa y las condiciones de los ciclos de la amplificación del canal *hSlo3*.

En este trabajo se contó con el apoyo técnico de:

La M.V.Z Elizabeth Mata, encargada del Bioterio; al M. en C. Jorge Arturo Yáñez y al Dr. Paul Gaytán, de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas; al M. en C. Andrés Saralegui y a la Q.F.B y Xóchitl Alvarado, de la Unidad de Microscopía Confocal, del Instituto de Biotecnología, UNAM *Campus* Morelos.

13. Referencias

- [1] H. M. Florman and T. Ducibella, "Fertilization in Mammals," in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed., J. D. Neill, Ed. Elsevier, 2006, pp. 55 – 112.
- [2] F. J. McPherson and P. J. Chenoweth, "Mammalian sexual dimorphism.," *Animal reproduction science*, vol. 131, no. 3–4, pp. 109–22, Apr. 2012.
- [3] M. Eisenbach and L. C. Giojalas, "Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 7, no. 4, pp. 276–85, Apr. 2006.
- [4] D. H. Owen and D. F. Katz, "A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant.," *Journal of andrology*, vol. 26, no. 4, pp. 459–69, 2005.
- [5] N. S. Juyena and C. Stelletta, "Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa.," *Journal of andrology*, vol. 33, no. 4, pp. 536–51, 2012.
- [6] L. Han, M. Monné, H. Okumura, T. Schwend, A. L. Cherry, D. Flot, T. Matsuda, and L. Jovine, "Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3.," *Cell*, vol. 143, no. 3, pp. 404–15, Oct. 2010.
- [7] P. M. Wassarman, L. Jovine, H. Qi, Z. Williams, C. Darie, and E. S. Litscher, "Recent aspects of mammalian fertilization research.," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 234, no. 1–2, pp. 95–103, Apr. 2005.
- [8] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Treviño, "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa.," *Physiological reviews*, vol. 91, no. 4, pp. 1305–55, Oct. 2011.
- [9] P. M. Wassarman, L. Jovine, and E. S. Litscher, "A profile of fertilization in mammals.," *Nature cell biology*, vol. 3, no. 2, pp. E59–64, Feb. 2001.
- [10] M. D. Papaioannou, J.-L. Pitetti, S. Ro, C. Park, F. Aubry, O. Schaad, C. E. Vejnar, F. Kühne, P. Descombes, E. M. Zdobnov, M. T. McManus, F. Guillou, B. D. Harfe, W. Yan, B. Jégou, and S. Nef, "Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice.," *Developmental biology*, vol. 326, no. 1, pp. 250–9, Feb. 2009.
- [11] C. Pineau, A. Dupaix, and B. Je, "Recent Advances and Techniques in In Vitro Toxicology The Co-culture of Sertoli Cells and Germ Cells: Applications in Toxicology," vol. 13, 1999.
- [12] Y. Clermont, "Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.," *Physiological reviews*, vol. 52, no. 1, pp. 198–236, Jan. 1972.

- [13] S. Pesch and M. Bergmann, "Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation.," *Micron*, vol. 37, no. 7, pp. 597–612, Jan. 2006.
- [14] J. P. Fouquet and M. L. Kann, "The cytoskeleton of mammalian spermatozoa.," *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, vol. 81, no. 2, pp. 89–93, Jan. 1994.
- [15] D. W. Burgos, Mario H; Fawcett, "Studies on the fine structure of the mammalian testis," *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, vol. 1, pp. 287 – 300, 1955.
- [16] G. a Cornwall, "New insights into epididymal biology and function.," *Human reproduction update*, vol. 15, no. 2, pp. 213–27, 2009.
- [17] P. E. Visconti, D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltrán, J. J. Acevedo, and A. Darszon, "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation.," *Asian journal of andrology*, vol. 13, no. 3, pp. 395–405, May 2011.
- [18] H. Rodriguez-Martinez, "Role of the oviduct in sperm capacitation.," *Theriogenology*, vol. 68 Suppl 1, pp. S138–46, Sep. 2007.
- [19] S. S. Suarez, "Control of hyperactivation in sperm.," *Human reproduction update*, vol. 14, no. 6, pp. 647–57, 2008.
- [20] R. Yanagimachi, "The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation," *J. Reprod. Fert.*, vol. 23, pp. 193–196, 1970.
- [21] S. S. & X. D. Suarez, "Hyperactivation Enhances Mouse Sperm for Penetrating Viscoelastic the," *Biology of Reproduction*, vol. 691, pp. 686–691, 1992.
- [22] D. Wang, S. M. King, T. a Quill, L. K. Doolittle, and D. L. Garbers, "A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility.," *Nature cell biology*, vol. 5, no. 12, pp. 1117–22, Dec. 2003.
- [23] D. Wang, J. Hu, I. A. Bobulescu, T. a Quill, P. McLeroy, O. W. Moe, and D. L. Garbers, "A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC).," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 22, pp. 9325–30, May 2007.
- [24] C. M. Santi, P. Martínez-López, J. L. de la Vega-Beltrán, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, and L. Salkoff, "The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility.," *FEBS letters*, vol. 584, no. 5, pp. 1041–6, Mar. 2010.
- [25] J. L. Bailey, "Factors regulating sperm capacitation.," *Systems biology in reproductive medicine*, vol. 56, no. 5, pp. 334–48, Oct. 2010.
- [26] D. Ickowicz, M. Finkelstein, and H. Breitbart, "Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases.," *Asian journal of andrology*, vol. 000, no. 000, p. 0, Sep. 2012.
- [27] R. a P. Harrison and B. M. Gadella, "Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation.," *Theriogenology*, vol. 63, no. 2, pp. 342–51, Jan. 2005.

- [28] H. Chang and S. S. Suarez, "Two distinct Ca(2+) signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice.," *Biology of reproduction*, vol. 85, no. 2, pp. 296–305, Aug. 2011.
- [29] J. C. Chávez, E. O. Hernández-González, E. Wertheimer, P. E. Visconti, A. Darszon, and C. L. Treviño, "Participation of the Cl-/HCO(3)- exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl- channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation.," *Biology of reproduction*, vol. 86, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2012.
- [30] J. G. McCoy and C. M. Nimigean, "Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1818, no. 2, pp. 272–85, Feb. 2012.
- [31] D. L. Minor, "Potassium channels: life in the post-structural world.," *Current opinion in structural biology*, vol. 11, no. 4, pp. 408–14, Aug. 2001.
- [32] Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. Mackinnon, "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel," *Nature*, vol. 423, pp. 42–48, 2003.
- [33] L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon, "Mutations in the K+ channel signature sequence.," *Biophysical journal*, vol. 66, no. 4, pp. 1061–7, Apr. 1994.
- [34] L. Salkoff, A. Butler, G. Ferreira, C. Santi, and A. Wei, "High-conductance potassium channels of the SLO family.," *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 7, no. 12, pp. 921–31, Dec. 2006.
- [35] U. S. Lee and J. Cui, "BK channel activation: structural and functional insights.," *Trends in neurosciences*, vol. 33, no. 9, pp. 415–23, Sep. 2010.
- [36] T. M. Weiger, A. Hermann, and I. B. Levitan, "Modulation of calcium-activated potassium channels.," *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, vol. 188, no. 2, pp. 79–87, Mar. 2002.
- [37] X.-M. Xia, X. Zhang, and C. J. Lingle, "Ligand-dependent activation of Slo family channels is defined by interchangeable cytosolic domains.," *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no. 24, pp. 5585–91, Jun. 2004.
- [38] P. Orio, P. Rojas, G. Ferreira, and R. Latorre, "New Disguises for an Old Channel : MaxiK Channel - -Subunits," pp. 156–161, 2012.
- [39] a Yuan, M. Dourado, a Butler, N. Walton, a Wei, and L. Salkoff, "SLO-2, a K+ channel with an unusual Cl- dependence.," *Nature neuroscience*, vol. 3, no. 8, pp. 771–9, Aug. 2000.
- [40] A. Yuan, C. M. Santi, A. Wei, Z. W. Wang, K. Pollak, M. Nonet, L. Kaczmarek, C. M. Crowder, and L. Salkoff, "The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family.," *Neuron*, vol. 37, no. 5, pp. 765–73, Mar. 2003.

- [41] H. Lim, B. Park, H. Choi, C. Park, S. Hyun, and J. Ahnn, "Identification and characterization of a putative *C. elegans* potassium channel gene (*Ce-slo-2*) distantly related to Ca^{2+} - activated K^{+} channels," *Gene*, vol. 240, pp. 35–43, 1999.
- [42] M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito, and L. Salkoff, "Slo3, a novel pH-sensitive K^{+} channel from mammalian spermatocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3509–16, Feb. 1998.
- [43] B. Navarro, Y. Kirichok, and D. E. Clapham, "KSper, a pH-sensitive K^{+} current that controls sperm membrane potential.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 18, pp. 7688–92, May 2007.
- [44] P. Martínez-López, C. M. Santi, C. L. Treviño, A. Y. Ocampo-Gutiérrez, J. J. Acevedo, A. Alisio, L. B. Salkoff, and A. Darszon, "Mouse sperm K^{+} currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 381, no. 2, pp. 204–9, Apr. 2009.
- [45] W. H. Organization, *Examination and processing of human semen*, 5° ed. Suiza: , 2010, pp. 7–113.
- [46] N. Gamper, J. D. Stockand, and M. S. Shapiro, "The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels.," *Journal of pharmacological and toxicological methods*, vol. 51, no. 3, pp. 177–85, 2005.
- [47] A. P. & G. C. Renier M., A. Tamanini, E. Nicolis, R. Rolfini, J-L. Miller, "Use of a Membrane Potential - Sensitive Probe to Assess Biological Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.," *Human Gene Therapy*, vol. 1283, no. October, pp. 1275–1283, 1995.
- [48] Y. Jiang and R. MacKinnon, "The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography.," *The Journal of general physiology*, vol. 115, no. 3, pp. 269–72, Mar. 2000.
- [49] Q.-Y. Tang, Z. Zhang, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "Block of mouse Slo1 and Slo3 K^{+} channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine.," *Channels (Austin, Tex.)*, vol. 4, no. 1, pp. 22–41, 2010.
- [50] X. Zhang, X. Zeng, and C. J. Lingle, "Slo3 K^{+} channels: voltage and pH dependence of macroscopic currents.," *The Journal of general physiology*, vol. 128, no. 3, pp. 317–36, Sep. 2006.
- [51] X. Zhang, X. Zeng, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "pH-regulated Slo3 K^{+} channels: properties of unitary currents.," *The Journal of general physiology*, vol. 128, no. 3, pp. 301–15, Sep. 2006.
- [52] X.-H. Zeng, C. Yang, S. T. Kim, C. J. Lingle, and X.-M. Xia, "Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^{+} current in mouse spermatozoa.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 14, pp. 5879–84, Apr. 2011.
- [53] M. D. Leonetti, P. Yuan, Y. Hsiung, and R. Mackinnon, "Functional and structural analysis of the human SLO3 pH- and voltage-gated K^{+} channel.," *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 2012, Nov. 2012.

- [54] C. Yang, X.-H. Zeng, Y. Zhou, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 48, pp. 19419–24, Nov. 2011.
- [55] C.-T. Yang, X.-H. Zeng, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "Interactions between beta subunits of the KCNMB family and Slo3: beta4 selectively modulates Slo3 expression and function.," *PloS one*, vol. 4, no. 7, p. e6135, Jan. 2009.
- [56] V. N. Uebele, S. K. England, a Chaudhary, M. M. Tamkun, and D. J. Snyders, "Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 5, pp. 2406–12, Feb. 1996.