



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BÚSQUEDA DE ANTAGONISTAS PARA EL
CANAL DE CALCIO CATSPER DE HUMANO,
MEDIANTE TOXINAS DEL GÉNERO *MICRURUS***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

IVONNE LIZBETH CANO BACA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO PICONES MEDINA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Cano

Baca

Ivonne Lizbeth

50 95 87 90

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

107000303

2. Datos del tutor

Dr.

Arturo

Picones

Medina

3. Datos del sinodal 1.

Dr.

Alberto

Darszon

Israel

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Alejandro

Alagón

Cano

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Arlet del Carmen

Loza

Huerta

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Carlos Jesús

Balderas

Valdivia

7. Datos del trabajo escrito.

Título: Búsqueda de antagonistas para el canal CatSper, específico del espermatozoide de humano, mediante toxinas de serpientes del género *Micrurus*.

66 páginas

2017

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM en la Ciudad de México, México.



Como parte del proyecto de investigación: “Desarrollo de un contraceptivo masculino basado en la inhibición específica de los canales iónicos CatSper y Slo3 del espermatozoide humano”

Financiado por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación, con el número de proyecto 039/2013.



Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del *Biol. Héctor Miguel Cardoso Torres* para la preparación de la biblioteca de las fracciones de toxinas aisladas mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC) como parte del Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa).

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico de la *Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta* para la evaluación del primer tamizaje de fracciones de venenos en los espermatozoides de humano en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa).

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo del *Dr. Jesús Esteban Pérez Ortega* por el desarrollo del software DrugSearchWare, el cual permitió analizar más rápido los resultados obtenidos directamente del equipo automatizado.

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del *Fis. Cesar Oliver Lara Figueroa* por abastecer los reactivos necesarios utilizados en la parte experimental del proyecto en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa desde hace 10 años, cuando ingrese a Iniciación Universitaria y hasta ahora en la Facultad de Ciencias. Porque más que solo brindarme conocimientos, me ha cobijado y ha formado, en gran parte, la persona que ahora soy.

Al LaNCa, en el Instituto de Fisiología Celular, donde pude desarrollar esta tesis y por todo el conocimiento que me he llevado de ésta. Así mismo mi tutor de tesis, Dr. Picones, por darme la oportunidad de laborar en su equipo de trabajo, por todas y cada una de sus atenciones y correcciones.

A mis sinodales, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo, aprecio sus correcciones y agradezco el conocimiento transmitido ya que me servirá para toda la vida profesional siguiente.

A los integrantes del LaNCa, quienes me apoyaron en mi estadía. Por poner su grano o el bulto completo de arena en mi camino de aprendizaje académico y personal, por ayudarme y corregirme, por su tiempo, por las porras y por las risas en nuestro momento de auge, realmente la pase muy bien en el laboratorio con sus pláticas y enseñanzas. En especial a Arlet, gracias por estar conmigo, respirar profundo y ayudarme con tu conocimiento, eres un gran ejemplo a seguir para mí. Y Erick, maestro y amigo, gracias por tu apoyo.

A los maestros que enseñan con pasión y con quienes afortunadamente me tocó tomar clase en la carrera. Por compartir más que conocimiento, por transmitir humanidad y amor a la naturaleza y la investigación.

Dedicatoria

A mi mamá, por siempre estar para mí y apoyarme en todo momento, tanto académica, moral y sobre todo dancísticamente. Por tu amor, por siempre estar dándome fuerza y motivación, por tu lucha y sacrificios que siempre he admirado de ti.

A mi papá por cada abrazo. Agradezco por todo el apoyo brindado a través de mis estudios, por los estímulos y la confianza que depositas en mí en cada momento, por inculcarme valores y superación desde niña. Y sobre todo por tu amor.

A mis hermanos Gris, Emanuel y Mayol. Por molestarme y dejarme molestarlos pero sobre todo por cuidar de mí. Porque al final de todo, lo único que te queda son tus hermanos. Manina siempre has estado conmigo para aconsejarme y apoyarme en todo, cuidándome mucho de niña junto con abueita Lola y tía María,

A mis amigos del alma, como dicen, la familia que eliges. Por qué con ustedes es con quienes he crecido, quienes en buen modo han sido mi gran apoyo en la vida y los grandes responsables de mi madurez (si no es mucha también es su culpa), como tu Edwin. Y en especial a Myri, porque hemos crecido juntas y como hermanas estos últimos años.

A mis abuelitos Jesús y Cirenía, por recibirme en su hogar y apoyarme siempre que a mis padres les era imposible hacerlo, o bien para incentivarme en cada paso, así como por preocuparse y estar pendiente de mí siempre.

Este logro también es de todos ustedes y con mi promesa de seguir siempre adelante

... *Gracias.*

Índice

§ Resumen	4
§ Introducción	5
1. Un Problema Social	5
2. Fecundación	6
3. Espermatogénesis en humano	7
4. Espermatozoide humano: Morfología y Fisiología.....	9
5. Eventos para la fecundación.....	11
6. Canales Iónicos en Espermatozoides	14
7. Fluorescencia y su medición experimental.....	14
8. El Género <i>Micrurus</i>	16
§ Antecedentes.....	19
§ Justificación	25
§ Hipótesis.....	26
§ Objetivos	26
§ Materiales y Método	27
1. Reactivos.....	27
2. Medios celulares y uso	27
3. Muestras Biológicas.....	28
4. Equipo Instrumental.....	31
5. Análisis estadístico	36
§ Resultados.....	39
1. Cromatograma.....	39
2. Respuesta de progesterona en presencia de las fracciones polipeptídicas y respuesta del Ca ²⁺	40
§ Discusión	56
§ Conclusiones	58
§ Perspectivas	59
§ Literatura citada.....	60

Tablas de contenido

Figura 1. Proceso de espermatogénesis. Etapa mitótica de las espermatogonias seguida por meiosis I y II para dar lugar a las espermátidas.....	9
Figura 2. Morfología de espermatozoide de humano. a) Estructura del espermatozoide, compuesto por la cabeza y el flagelo (pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. b) Se muestran los componentes principales de la cabeza y de la pieza media del espermatozoide..	11
Figura 3. Funcionamiento y regulación del canal CatSper..	21
Figura 5. Placa de 96 pozos (BRAND) transparente de fondo plano.	27
Figura 6. Ilustración gráfica de preparación de la muestra.	30
Figura 7. a) Experimento para $[Ca^{2+}]_i$, inducido por Pg. b) Experimento para la concentración $[Ca^{2+}]_i$	31
Figura 8. Esquema del equipo FlexStation 3. Tomada de MolecularDevices 2017.	32
Figura 9. Copia de la imagen de la pantalla proyectada por el programa SoftMax Pro.	33
Figura 10. Resumen de la configuración de los parámetros del programa SoftMax Pro seleccionados para la ejecución de los ensayos experimentales de esta tesis.	34
Figura 11. Ejemplo de lectura de la cinética experimental del ensayo de respuesta a la Progesterona.....	35
Figura 12. Ejemplo de lectura de la cinética experimental del ensayo de respuesta a solamente la fracción polipeptídica.....	35
Figura 13. Ejemplo ilustrativo del procedimiento de análisis mediante el programa el programa DrugSearchWare (Pérez-Ortega y Picones, 2016).....	37
Figura 14. Ficha con el cromatograma de la especie <i>Micrurus tener</i>	40
Gráfica 1. Cinética muestra del experimento general, a los 30 seg. se agregaron los compuestos: Negro = Control negativo, Pg 4 $\mu M/\mu l$. Rojo = Control positivo , Mibefradil 44.4 $\mu M/\mu l$. Azul = Control basal, medio de registro humano (MRH) pH7.4. Verde = Toxina $6.7 \times 10^{-3} \mu M/\mu l$. Y a los 270seg se agrega Ionomicina 10 $\mu M/\mu l$ en cada condición.	41

Gráfica 2. Fracciones polipeptídicas ya probadas en el LaNCa con relación a la respuesta a progesterona.	42
Gráfica 3. Promedios de (RFU) de las 61 fracciones provenientes de venenos de serpientes coralillo, probadas en el LaNCa, con relación a la respuesta a Pg.	43
Gráfica 4. <i>Micrurus surinamensis</i> . n=3.....	45
Gráfica 5. <i>Micrurus laticollaris</i> . n=3	46
Gráfica 6. <i>Micrurus tener</i> . n=3.....	46
Gráfica 7. <i>Micrurus distans</i> . n=1 o 3.....	47
Gráfica 8. <i>Micrurus latifasciatus</i> . n=3.	48
Gráfica 9. <i>Micrurus diastema</i> . n=1..	49
Gráfica 10. Promedios de porcentaje de fluorescencia de 6 fracciones polipeptídicas probadas sobre la respuesta a progesterona (transitorio).	50
Gráfica 11. <i>Micrurus surinamensis</i> 26.72 b. Dosis Respuesta. n=3.	51
Gráfica 12. <i>Micrurus surinamensis</i> 28.63. Dosis respuesta. n=3.....	52
Gráfica 13. <i>Micrurus laticollaris</i> 21.7. Dosis respuesta. n=3	52
Gráfica 14. <i>Micrurus laticollaris</i> 20.2. Dosis respuesta. n=3	53
Gráfica 15. <i>Micrurus latifasciatus</i> 22.64. Dosis respuesta. n=3	55
Gráfica 16. <i>Micrurus tener</i> 23.4. Dosis respuesta. n=3.....	55
Tabla 1. Información de las especies de <i>Micrurus</i> , de las cuales se estudiaron fracciones de su veneno.....	18
Tabla 2. Composición de la solución de Medio de Registro Humano (MRH).....	27
Tabla 3. Extracción de la base de datos empleada para el manejo y análisis de los mismos.....	38
Tabla 4. Extracción de la base de datos empleada para el manejo y análisis de datos resultantes	44
Tabla 5. Fracciones polipeptídicas que presentaron una inhibición de influjo de Ca ²⁺ en presencia de progesterona (nueve en total).....	49

Resumen

Actualmente la tasa de crecimiento de la población mundial ha decaído y aun así hay más de 7 mil millones de habitantes. Las proyecciones para México indican que la población seguirá creciendo hasta alcanzar cerca de 130 millones para el año 2040. Si bien el fin de todo organismo biológico es la autopropagación, los humanos hemos sobrepoblado la Tierra, de tal manera que los recursos naturales han llegado a ser insuficientes.

Para ayudar a mantener un crecimiento adecuado de la población, se han diseñado una amplia gama de anticonceptivos. Existe un vasto conocimiento de la fecundación y de la fisiología del espermatozoide humano; se sabe que la hiperactivación es un evento en el cual el batido flagelar es asimétrico y vigoroso, requisito necesario para que se lleve a cabo la fecundación, y se origina por la entrada de calcio (Ca^{2+}) al citoplasma del espermatozoide, principalmente a través de CatSper, canal iónico presente exclusivamente en la membrana plasmática de este tipo celular.

El CatSper es activado por la Progesterona (Pg), hormona esteroidea femenina que estimula el flujo de Ca^{2+} intracelular bifásico, comprendido por una fase transitoria y otra sostenida subsecuente. La inactivación funcional de CatSper provocaría la detención en el influjo de iones Ca^{2+} , haciéndole imposible al espermatozoide desplazarse eficientemente por los conductos femeninos hasta el encuentro con el óvulo y evitándose así la fecundación.

La presente investigación tuvo como objetivo la búsqueda de alguna fracción polipeptídica, con actividad ionotóxica, proveniente de venenos de distintas especies del género *Micrurus* (conocidas comúnmente como coralillos, corales o serpientes de coral de la familia Elapidae y que son un recurso con gran potencial de aplicación en diversas áreas de las industrias biomédica y biotecnológica), aisladas mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC), que inhiba la entrada de calcio a través del canal CatSper.

Mediante la técnica de detección automatizada de fluorescencia efectuada por el multilector de placa FlexStation 3, para la detección del influjo de Ca^{2+} , los espermatozoides de humano se incubaron con las fracciones polipeptídicas aisladas y se analizaron los cambios en la emisión de fluorescencia, consecuente a los cambios en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Después de estandarizar las condiciones experimentales para evaluar la acción de 61 fracciones polipeptídicas de venenos del género *Micrurus*, mediante un ensayo biofarmacológico, funcional y fisiológico de la respuesta a la Pg, se pudo tamizar e identificar nueve fracciones que redujeron la respuesta a la Pg en espermatozoides no capacitados de humano. A partir de estos datos se procedió a caracterizar las curvas dosis-efecto en seis de estas fracciones y dos de ellas (denominadas en esta tesis como LaNCa1 y LaNCa2) mostraron una dependencia con su concentración.

Si la aplicación de bloqueadores de los canales iónicos de espermatozoides, con las características de potencia y especificidad farmacológicas de una gran variedad de fracciones polipeptídicas, deteriora su función al afectar sus actividades fisiológicas normales, LaNCa 1 y LaNCa 2 pudieran constituir la base química para el desarrollo futuro de un agente farmacológico que pudiese funcionar como un anticonceptivo masculino.

Introducción

1. Un Problema Social

Actualmente la tasa de crecimiento de la población mundial ha decaído y aun así somos más de 7.3 mil millones de habitantes. Si bien el fin de todo organismo biológico es la autopropagación, los humanos hemos sobrepoblado la Tierra, sobre todo en el sentido de que los recursos naturales han llegado a ser insuficientes y se convierte en un problema mantener un balance sustentable de la naturaleza. Esta sobrepoblación conlleva problemas tan severos y alarmantes como la industrialización, la contaminación ambiental y la escasez de alimentos; también, de manera debatible, lo es la pobreza, donde una adecuada planificación familiar ayudaría a disminuir problemas de sustento en familias de escasos recursos, por ejemplo.

En México, a pesar de la reducción en la tasa de crecimiento, el incremento neto de la población en el periodo 2000-2005 fue de casi 5.8 millones de personas, es decir, se tuvo un crecimiento del 1% anual. En el censo de Población y Vivienda 2010, se contaron 112 millones de habitantes, y en la encuesta Intercensal del 2015 se contaron 119, 938, 473 habitantes (INEGI, 2017). Según las proyecciones elaboradas por el Conapo, la población seguirá creciendo hasta alcanzar cerca de 130 millones en el año 2040, para posteriormente iniciar lentamente su descenso (Living planet report, 2004).

Una de las grandes medidas a nivel mundial para detener este crecimiento poblacional es el uso de métodos anticonceptivos. La anticoncepción es la prevención del embarazo utilizando métodos de forma transitoria y recuperando la fertilidad al dejar de usarlos. Existen una gran variedad de métodos anticonceptivos gracias al arduo estudio en años previos. Dentro de los numerosos métodos para evitar el embarazo están la administración de medicación hormonal que contienen estrógenos y progestina (parche, anillo, inyección y píldora), los dispositivos contraceptivos (barreras como el dispositivo intrauterino, DIU), los periodos de abstinencia sexual y la cirugía, la cual puede ser temporal o irreversible. Cada uno con un grado de confiabilidad diferente. Sin embargo, de la misma manera que Picones y Hernández-Cruz (2014) afirman, a excepción del condón y la vasectomía, todos éstos son aplicados en mujeres.

Existen grandes dudas acerca de si el uso de anticonceptivos, tanto hormonales como físicos, conlleva algún tipo de repercusión en el organismo de la mujer. Son bien conocidos los desajustes en los periodos de menstruación, el aumento de cólicos al usar píldoras anticonceptivas o el riesgo de ir perdiendo el porcentaje de

fertilidad cuando estos son usados por largos periodos de tiempo, además de aumentar el riesgo de cáncer, o bien, problemas cardiovasculares.

Los tratamientos hormonales incluyen compuestos que son secretados naturalmente por el organismo como la prostaglandina, pero que afectan si su concentración aumenta de su nivel natural. Existen estudios que indican que los riesgos de cáncer de endometrio y de ovario se reducen con el uso de los anticonceptivos orales, mientras que el riesgo de cáncer de seno, cérvix (o cuello uterino) y de hígado aumentan (Burkman et al., 2004).

En otro estudio (Moreno et al., 2002), los investigadores encontraron un aumento de casi el triple de riesgo entre las mujeres que habían usado anticonceptivos orales de 5 a 9 años en comparación con mujeres que nunca los habían usado. El uso a largo plazo de los anticonceptivos orales podría ser un cofactor que aumenta el riesgo de carcinoma de cuello uterino hasta cuatro veces más en las mujeres que son positivas para el DNA del virus de papiloma humano (VPH) cervical.

El crear métodos en los que la mujer deje de llevar la exclusiva responsabilidad del control natal y de escoger un método anticonceptivo que evite un embarazo no deseado, es una idea relativamente reciente que es apoyada por este género, ya que dejaría de ser el cuerpo femenino el que esté expuesto a introducir objetos extraños, no naturales, dolores intensos o/y a desajustes hormonales, entre otros (OMS, 2017).

En contraste con las altas tasas de sobrepoblación, en muchos países también se ha venido dando un número alto de casos de infertilidad, en México existen 2.6 millones de casos de infertilidad, a los que cada año se suman nuevos casos (INEGI b, 2013). Ambas circunstancias, la búsqueda de anticonceptivos y la infertilidad, son las causas más enérgicas por las cuales los estudios sobre la fecundación humana se han incrementado.

2. Fecundación

La mayoría de los vertebrados se reproducen en forma sexual. La reproducción sexual requiere de dos acontecimientos: la meiosis y la fecundación. En los vertebrados, que en su gran mayoría son diploides, la meiosis produce gametos, las únicas formas haploides del ciclo vital. Los gametos masculinos y femeninos se producen en las gónadas del macho y la hembra, respectivamente (Gilbert, 2005).

El aparato reproductor de los vertebrados, en general, está compuesto de órganos sexuales primarios (gónadas) y secundarios: conductos y órganos copuladores

(Flores y Aranzábal, 2002). Las gónadas se empiezan a desarrollar como dos pequeñas protuberancias que crecen en la región media dorsal de la cavidad celómica. En este momento se les denominan crestas gonadales, las cuales posteriormente se van a diferenciar en los testículos en el caso de los machos o en ovarios como es el caso de las hembras (Balinsky y Fabian, 1998).

La función principal de las gónadas es la producción de gametos y de hormonas esteroideas. Las gónadas están íntimamente relacionadas con el aparato urinario. Durante la etapa embrionaria ocurre la diferenciación de la gónada; junto a esta persisten dos conductos paralelos entre sí: el mesonéfrico o conducto de Wolff y el paramesonéfrico o conducto de Müller. En los machos de la mayoría de los vertebrados, los conductos de Wolff se van a diferenciar como espermiducto (conductos deferentes, epidídimo y ámpula) para la salida del espermatozoide. En las hembras a partir del conducto de Müller se desarrollan los oviductos. En el oviducto se lleva a cabo la fecundación, la formación de cubiertas del ovocito, el transporte de los ovocitos y la implantación embrionaria en organismos vivíparos (Curtis et al., 2006).

La fecundación en los mamíferos es un proceso sincronizado y complejo que involucra una serie de interacciones entre el espermatozoide, gameto masculino y el óvulo, gameto femenino, culminando con la formación un cigoto, el cual generará un nuevo organismo (Gilbert, 2005). Los eventos iniciales en la fecundación implican la activación de la movilidad o hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosomal (RA) (Darszon et al., 2001).

3. Espermatogénesis en humano

La producción de espermatozoides ocurre desde las células germinales primordiales (CGP's), una vez que las CGP's llegan a la cresta genital de un embrión macho, quedan incorporadas a los tubos seminíferos y se convierten en espermatogonias (Gilbert, 2005).

El proceso comienza en la pubertad cuando se desencadena la actividad hormonal iniciada por la liberación de las gonadoliberinas, hormonas hipotalámicas que estimulan la liberación hormonal a partir de la adenohipófisis. La hormona luteinizante (LH) estimula la producción de testosterona por las células de Leydig, responsables del proceso de maduración de los gametos. La hormona folículo-estimulante (FSH) también interviene en este proceso ya que se encarga de estimular a las células de Sertoli para producir proteínas necesarias para la maduración y expresión génica de los gametos, entre otras importantes funciones (Cabero et al., 2007; Matorras, 2008).

La espermatogénesis es el proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos que se encuentran en los testículos. En amniotas (saurópsidos y mamíferos) la espermatogénesis es tubular, es decir, que se lleva en los túbulos; radial, ya que se origina de la periferia del túbulo hacia el centro o luz del túbulo; y centrípeta por que los estadios más avanzados van hacia la luz o lumen y los más basales en la periferia (Gilbert, 2005).

Este evento fisiológico consiste en dos etapas proliferativas: renovación de las células madre y proliferación mitótica de las espermatogonias, seguidas por meiosis y espermiogénesis, durante la cual las espermatidas haploides se transforman en espermatozoides, vectores genómicos flagelados móviles (Schulz y Nóbrega, 2009). De este modo, un pequeño número de células madre espermatogoniales diploides, producen espermatozoides altamente diferenciados que contienen un genoma haploide recombinado (Rey, 2012).

En la fase de multiplicación, las espermatogonias originan por mitosis nuevas células germinales llamadas B-espermatogonia. En la fase de crecimiento aumentan su tamaño y se transforman en espermatocitos primarios, en la fase de maduración se produce la meiosis, donde los espermatocitos primarios ($2n$) se dividen por meiosis I y originan dos espermatocitos de segundo orden (n) o secundarios; acto seguido, tras la meiosis II, forman cuatro espermatidas (n) (Sadler, 2004; Pérez, 2007). Por último, cada espermatida se transforman en un espermatozoide, a esta fase se le denomina espermiogénesis. El proceso es ilustrado en la **Figura 1**.

En la espermiogénesis en humano se dan una serie de cambios en las espermatidas hasta su transformación en espermatozoides. Este proceso implica una reducción de la cantidad de citoplasma generando un cuerpo residual, la condensación de la cromatina, la formación de la vesícula arosomal, la formación del flagelo a partir de a partir de la región centriolar y el agrupamiento de las mitocondrias en la base del flagelo (Huleihel, AbuElhija and Lunenfeld, 2007).

La primera etapa implica la construcción de la vesícula acrosómica. El núcleo se mueve del centro hacia un polo, el aparato de Golgi queda justo entre el núcleo y la membrana. Uno de los centriolos se ubica junto al núcleo llamándose centriolo proximal y el otro se ubica junto a la membrana llamándose centriolo distal. La estructura que se forma por el aparato de Golgi en la parte anterior, se denomina acrosoma o capuchón, este contiene enzimas líticas que permiten al espermatozoide atravesar las células que rodean al óvulo así como las capas externas de este (Darszon et al., 2011).

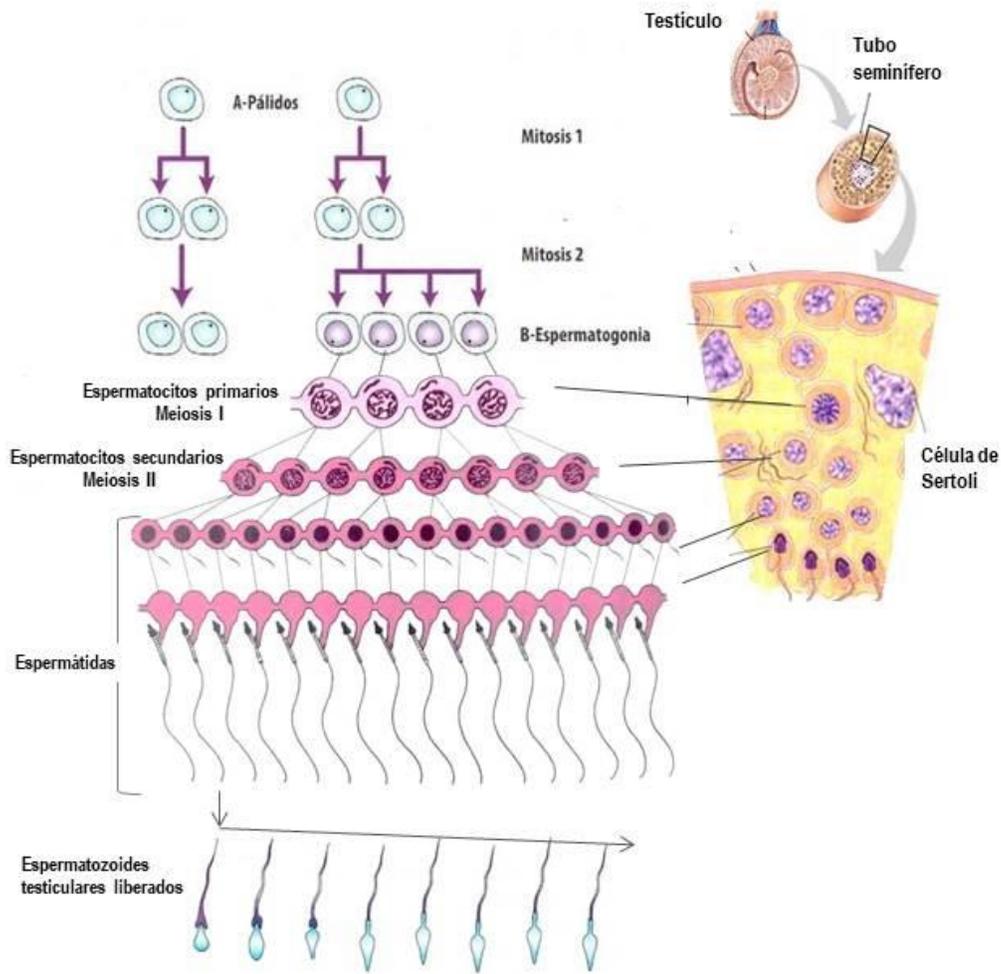


Figura 1. *Proceso de espermatogénesis.* Etapa mitótica de las espermatogonias seguida por meiosis I y II para dar lugar a las espermatidas. Modificada de Gilbert, 2005 y Gutiérrez de Aguas, 2014.

4. Espermatozoide humano: Morfología y Fisiología

Desde la segunda mitad del siglo XVII, que Van Leeuwenhoek observó un espermatozoide en su microscopio y lo llamó "Animálculo" (Arita, 2003), el espermatozoide humano ha venido siendo objeto de gran interés y profundo estudio.

Morfológicamente consiste en una sola célula haploide con núcleo de gran tamaño que abarca la mayor parte de la llamada cabeza y un flagelo considerablemente largo. La cabeza tiene doble función: activadora y genética; su estructura es homogénea, el material cromosómico se encuentra densamente compactado y presenta la envoltura nuclear redundante. La cabeza es de forma oval en vista

frontal y piriforme en vista lateral, además está cubierta por el casquete acrosómico o acrosoma. El acrosoma del espermatozoide es un organelo con forma de capucha derivado del aparato de Golgi, ubicado en la región apical del espermatozoide y que forma una tapa sobre los dos tercios anteriores del núcleo (Torres, 2013).

El cuello une la cabeza con la pieza media, es corto y cónico, comienza con el gránulo acrosómico y termina en el cuerpo esférico, que es el centriolo anterior. El flagelo tiene función motriz y comienza con la pieza media, seguida de la principal y después la terminal. El flagelo está cubierto de una fina capa de citoplasma y una membrana plasmática.

La pieza media tiene la función metabólica, es el segmento interpuesto entre los dos centriolos y contiene un eje central denominado filamento axial o axonema, alrededor del cual se encuentran las mitocondrias que forman el filamento espiral. El axonema se extiende hasta la pieza principal y confiere movimiento al espermatozoide gracias a la hidrólisis de ATP. Además, posee los dos microtubulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos asociados con dineínas. Las dineínas son ATPasas que funcionan como motores moleculares y producen la fuerza motriz que impulsa el flagelo (Darszon et al., 2011).

La pieza principal representa las tres cuartas partes de la longitud total del espermatozoide, aquí se encuentran las enzimas glucolíticas que participan en el proceso de glucólisis. La pieza terminal es corta y muy delgada (Torres, 2013). En la **Figura 2** se muestran las partes anteriormente descritas.

Los espermatozoides se producen en los testículos, viajan pasivamente por el epidídimo y después por los conductos deferentes para posteriormente ser eyaculados junto con el líquido seminal hacia el tracto genital femenino y empezar su movimiento. Inicialmente, los espermatozoides presentan un batido flagelar simétrico con amplitud pequeña, y posteriormente se llevarán a cabo cambios fisiológicos como la capacitación y la RA, e iniciará un nado con movilidad hiperactivada. Se sabe que los flujos de iones Ca^{2+} son fundamentales para la movilidad, la capacitación y la RA (Darszon et al., 2011).

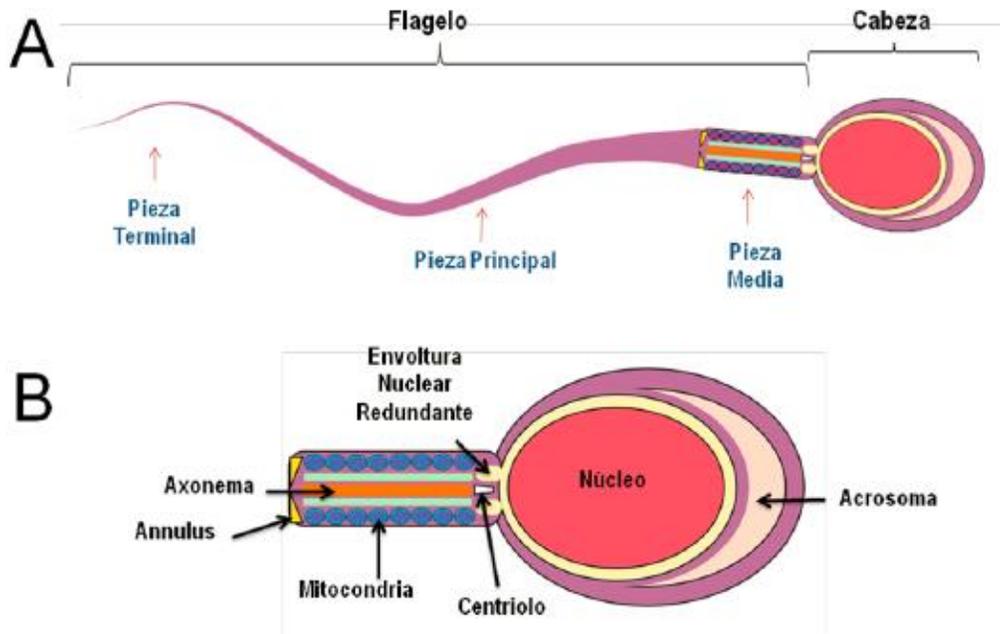


Figura 2. *Morfología de espermatozoide de humano.* A) Estructura del espermatozoide, compuesto por la cabeza y el flagelo (pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. B) Se muestran los componentes principales de la cabeza y de la pieza media del espermatozoide. El axonema se encuentra a lo largo de todo el flagelo. Tomada de Torres, 2013.

5. Eventos para la fecundación

a. Capacitación

La capacitación espermática es un proceso fisiológico y complejo el cual es experimentado por los espermatozoides, indispensable para adquirir la capacidad de fecundación y se lleva a cabo dentro del tracto genital femenino. A nivel molecular, la capacitación implica una serie de eventos de transducción de señales que incluyen la activación de las vías de fosforilación de cAMP-dependiente, la eliminación de colesterol que favorece la permeabilidad de Ca^{2+} y HCO_3^- , la hiperpolarización de la membrana plasmática y cambios en la permeabilidad iónica (Stival et al., 2016).

La capacitación también se caracteriza por el aumento en la concentración de calcio intracelular. Esto puede deberse al influjo de Ca^{2+} extracelular a través de CatSper (Cation Channel of Sperm) o por la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas (Chang and Suarez 2011). De igual manera, durante la capacitación aumenta el pH intracelular (pHi), este aumento es relevante en la vía de señalización que activa canales como el Slo3 y el canal permeable a Ca^{2+} , CatSper.

Se ha reportado que la hiperpolarización de la membrana de espermatozoides es completamente suprimida en presencia de una alta concentración de potasio (K^+) externo (60 mM), indicando la participación de canales de K^+ . En un estudio se utilizaron diferentes inhibidores de K^+ incluyendo caribdotoxina, sloxina y iberiotoxina (cuyo blanco son los canales Slo1) y clofilium (un bloqueador más específico para Slo3). Los datos indican que Slo1 y Slo3 podrían compartir el papel predominante en la asociación con la hiperpolarización de la capacitación de espermatozoide humano, en contraste con lo que se ha reportado anteriormente en los espermatozoides de ratón, donde los canales Slo3 son los principales contribuyentes a la hiperpolarización (López-González et al., 2014).

Además de los cambios en el flagelo, la capacitación también está relacionada con la capacidad de los espermatozoides para sufrir la reacción acrosomal inducida fisiológicamente. Si bien es necesaria la reacción del acrosoma para la fecundación y en un principio este proceso se considera parte del proceso de capacitación, otras opiniones consideran que la reacción del acrosoma es un evento posterior a la capacitación (Visconti et al., 2011).

b. Reacción Acrosomal

La reacción acrosomal es otro de los procesos importantes en mamíferos para que se lleve a cabo la fecundación. La RA consiste en la fusión de la membrana del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide produciéndose la liberación excitotónica del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna, con lo que la membrana plasmática del espermatozoide es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (del Rio et al., 2007). Los espermatozoides comienzan la RA antes de llegar a la zona pelucida (ZP) y son capaces de penetrar la zona, fusionarse con la membrana del ovocito y fecundar.

El contenido acrosomal incluye una mezcla única de enzimas líticas acrosomales, así como la hialuronidas, la acrosina y enzimas presentes en el lisosoma, peroxisoma e incluso en el citoplasma; Estas enzimas son reguladas por concentraciones de Ca^{2+} intracelular. El aumento de Ca^{2+} comienza en la pieza media y se propaga hacia el acrosoma a través de transportadores de membrana, como pueden ser canales iónicos, ATPasas o intercambiadores (Darszon et al., 2011).

Se considera a la ZP como el principal inductor de la RA, junto con otras sustancias en el tracto femenino como la acetilcolina y el GABA (Caballero-Campo et. al., 2006). Varios agentes fisiológicos, tales como la progesterona (Pg), la

albúmina, el líquido folicular, hormonas (incluyendo aminos biogénicas), enzimas hidrolíticas (especialmente proteasas), ácido hialurónico y glicoproteínas, están implicados en la inducción de la RA. En el ratón, los glicanos O-ligados de ZP3 están implicados en la RA, mientras que en los seres humanos, glicanos de ZP1, ZP3 y ZP4 son críticos para la inducción de RA (Gupta y Bhandari, 2011).

c. Hiperactivación

El tipo de movimiento del batido flagelar del espermatozoide activo y simétrico, no es suficiente para que el espermatozoide sea capaz de fecundar el óvulo, este debe volverse mucho más vigoroso y asimétrico. La hiperactivación (HA) se da por cambios en el ambiente iónico que van a facilitar el desplazamiento de los espermatozoides a través de los oviductos y de la mucosa para acceder a las capas que rodean el ovocito y así dar lugar a la fecundación (Quill et al., 2003).

Hay por lo menos dos fuentes de Ca^{2+} que contribuyen a la HA en el espermatozoide de los mamíferos. En primer lugar, la entrada de Ca^{2+} dependiente de pH por los canales CatSper en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo (Alasmari et al., 2013). En segundo lugar, la inducción de HA debida a la movilización del calcio almacenado en la región de la pieza intermedia y en el cuello, donde se encuentran las mitocondrias y la envoltura nuclear redundante respectivamente (Bedu-Addo et al., 2008).

El aumento de ATP y pH son requeridos por el axonema para producir la hiperactivación, para producir ésta característica de flexión profunda aglomerante de la hiperactivación completa, se requieren niveles altos de ATP en la solución de reactivación para producir motilidad activada, lo que indica un aumento del requerimiento de ATP para la hiperactivación (Ho et al., 2002). La producción de lactato desempeña un papel clave en la provisión de ATP para la motilidad en general y por lo tanto, para la hiperactivación. Una forma específica de células germinales de lactato deshidrogenasa, la LDH-C₄, es responsable de la mayor parte de la actividad de la LDH en el espermatozoide. Los ratones machos que son mutantes nulos para *Ldhc* son infértiles (Odet et al., 2008).

La activación puede ocurrir a un pH tan bajo como 7.0, lo que indica que el pH citoplasmático aumenta en el compartimiento axonemal de espermatozoides intactos en el momento de la hiperactivación (Ho et al., 2002). Un aumento del pH que activa los canales CatSper también estimularía directamente la flexión hiperactivada en el axonema. El tratamiento con NH_4Cl estimula una hiperactivación más intensa que el ionoforo a Ca^{2+} , Ionomicina, pero la ionomicina produce un aumento mayor en el Ca^{2+} intracelular (Suárez, 2008).

6. Canales Iónicos en espermatozoides

Los canales iónicos son macromoléculas proteicas especializadas en permitir la generación de corrientes eléctricas a través de membranas celulares. Es decir, permiten flujos de iones, modificando de esta manera el voltaje eléctrico de la membrana, así como las concentraciones de segundos mensajeros dentro de un amplio intervalo de tiempo.

En particular, los canales iónicos se pueden abrir permitiendo el flujo de millones de iones por segundo a través de la membrana, a favor de su gradiente electroquímico y mediante pequeños cambios conformacionales inducidos por la tensión membranal, diversos ligandos, cambios de fosforilación, variaciones del voltaje de membrana y otros eventos de señalización (Hille, 2001; Visconti et al., 2011).

Para el avance en la comprensión de los canales iónicos, dentro de la biología de los gametos masculinos, se han empleado como modelos experimentales los espermatozoides de ratón, de erizo de mar y de humano. En estos últimos se tiene establecida la presencia de al menos dos tipos de canales iónicos exclusivamente expresados en ellos: CatSper, el cual es un canal preferencialmente permeable a iones de calcio y que son motivo de estudio en esta tesis; y Slo3, permeable a iones potasio.

7. Fluorescencia y su medición experimental

Las moléculas tienen diferentes estados o niveles de energía. La forma en que una molécula absorbe radiación electromagnética es por medio de un proceso cuántico. Ciertas longitudes de onda pueden ser selectivamente absorbidas por una sustancia de acuerdo a su estructura molecular. Cuando la luz o rayos X llega a los electrones que se hallan en niveles de baja energía, se excitan y se “cambian” a una órbita de mayor energía. Pero el electrón permanece inestable en esta órbita de mayor energía y debe regresar a la órbita que le corresponde, cuando lo hace, libera la energía que absorbió. Esta energía se libera parcialmente en las sustancias fluorescentes como luz emitida (Martinez y Moctezuma, 2006).

La generación de luminiscencia a través de la excitación de una molécula por los fotones de luz ultravioleta o visible, es un fenómeno denominado fotoluminiscencia, que se divide en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la configuración electrónica del estado excitado y la trayectoria de las emisiones (Herman, 2015).

Hay dos razones principales para el uso extensivo de la espectrofluorimetría. La primera, es el alto nivel de sensibilidad y el amplio rango dinámico que pueden realizarse. En segundo lugar, la instrumentación requerida es conveniente y para la mayoría de propósitos puede adquirirse por un costo no muy elevado (Martinez y Moctezuma, 2006).

El lector microplacas FlexStation 3 es un robot usado en esta área ya que puede ser empleado en una variedad de estudios como lo son la cinética de movilización de calcio, ensayos de voltaje de membrana, cinética de enzimas, ensayos de viabilidad celular y la citotoxicidad, ensayos de captación de transportador de neurotransmisores, permeabilidad de la membrana, entre muchas otras aplicaciones (Molecular Devices, 2015).

Existe una gran cantidad de investigaciones que actualmente se llevan a cabo mediante tecnologías de tamizaje de alto rendimiento (“high-throughput screening, HTS”), como lo es el FlexStation 3, que ayudan a realizar investigaciones de una manera más eficaz. Ejemplo de esto es un estudio en el desarrollo de nuevos y mejores analgésicos opioides, donde se requiere de métodos de producción de alto rendimiento (HTS), para identificar agentes terapéuticos potenciales a partir de grandes bibliotecas de compuestos. En este estudio se describen dos ensayos en tiempo real basados en fluorescencia de μ -opioide (Knapman and Connor, 2015).

Un ejemplo más para el uso del FlexStation 3, se puede ver en una investigación con las mediciones de calcio intracelular para la caracterización funcional de los fenotipos neuronales. En el estudio de Glaser et al. (2016), las imágenes de calcio proporcionan diversa información celular que incluye amplitudes de señalización, localización celular, duración y frecuencia. La Microfluorimetría revela una señal que resume toda la población, y su uso está indicado para fines de selección de alto rendimiento.

El Ca^{2+} es un regulador de la función plaquetaria y tiene un papel crítico en la enfermedad trombótica, pero puede ser difícil de medir en plaquetas humanas frágiles. El ensayo del lector FlexStation 3, permite mediciones precisas y rápidas del agonista EC_{50} y estimaciones del antagonista IC_{50} , y podría apoyar el tamizaje de rendimiento de nuevos fármacos utilizando este tejido humano primario (Bye and Gibbins, 2015).

8. El Género *Micrurus*

Las serpientes de coral, coralillos o corales comprenden el grupo más diverso de la familia Elapidae, habitan en regiones tropicales y subtropicales de Asia y América, con una mayor diversidad y abundancia en el Nuevo Mundo. El género *Micrurus* está integrado por cerca de 84 especies de corales según The Reptile Database (2017) y es también el género más diverso de serpientes venenosas, seguido del género *Trimeresurus* (Familia Viperidae) con cerca de 50 especies.

En América tienen una distribución desde el sur de Estados Unidos al sur de Argentina, aproximadamente hasta los 40 grados de latitud sur, habitando casi todos los ecosistemas terrestres, desde el nivel del mar y hasta los 3,000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Las serpientes de coral se caracterizan por la presencia de anillos coloridos intercalados que incluyen el rojo, amarillo (o blanco) y negro, estos generalmente forman triadas (patrón de combinación de tres colores; Savaje and Slowinski, 1992; Roze, 2006). Miden desde 36 cm a un máximo de 1.5 m. Tienen la cola muy corta comparado con otros grupos de serpientes (Roze, 1996), de ahí deriva el nombre de género (*Micrurus*; micro = muy pequeño; uros = cola; de cola pequeña).

Los venenos de serpiente son producidos por glándulas especializadas que tienen un origen evolutivo común con el de las glándulas salivales (Kochva, 1987). Durante el periodo geológico Terciario Temprano, aparecieron en algunas serpientes especializaciones anatómicas con la función de inocular veneno (Apesteguía, 2007).

En la naturaleza, la función ecológica de las neurotoxinas consiste principalmente en paralizar a la víctima (generalmente presas de talla superior a la serpiente), impidiendo la acción locomotora, causar dolor al formar edema en el tejido miótico, reduciendo la viscosidad del plasma sanguíneo y por lo tanto aumentando su fluidez en los conductos y tejidos, relajando el músculo liso de conductos venosos y arteriales que faciliten el paso rápido de la toxina, y aumentando en un principio la frecuencia cardíaca. Como función ecológica secundaria, el veneno de los elápidos sirve como defensa contra enemigos naturales, logrando su incapacitación casi inmediata (Campbell y Lamar, 2004; Roze, 2006; Tanaka et al., 2010).

Los venenos de diferentes serpientes contienen proteínas pequeñas que tienen un tamaño similar y una disposición homóloga de puentes disulfuro como las α -neurotoxinas. Los tres bucles confinados con disulfuro tienen un aspecto característico de tres dedos. Entre estas proteínas existen varias toxinas muscarínicas que difieren en la selectividad hacia distintos subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina, fasciculinas que inhiben la acetilcolinesterasa,

calciseptinas y otras toxinas que bloquean los canales de Ca^{2+} tipo L. Las cardiotoxinas (o citotoxinas) aparentemente no tienen un receptor específico o un canal de iones objetivo, sino que forman canales en las membranas. Las dendroaspinas (mambinas) son distintas de todas las demás toxinas al tener una tríada RGD en el bucle III, y como resultado actúan como antagonistas de varios procesos de adhesión celular (Tsetlin, 1999).

El veneno de serpientes coralillos es una mezcla compleja compuesta principalmente de enzimas, proteínas no enzimáticas y péptidos, aunque en todos ellos se han descrito moléculas menos abundantes incluyendo lípidos, metales y nucleósidos (Aird, 2002). Entre los componentes peptídicos, los grupos más abundantes reportados en estos venenos son las fosfolipasas A2 (PLA_2) y las toxinas no enzimáticas de tres dedos (3FTx).

Las PLA_2 forman una familia creciente de enzimas dependientes de Ca^{2+} que hidrolizan el ácido graso desde la posición sn-2 del fosfolípido para liberar ácidos grasos libres y lisofosfolípidos de glicerofosfolípidos (Dennis, 1994). La característica de todas las α -neurotoxinas es la disposición de cuatro puentes disulfuro que forman un núcleo hidrófobo. De este núcleo sobresalen tres lazos confinados con disulfuro “dedos” I, II y III. Una característica prominente de la conformación de las α -neurotoxinas es una estructura β de cadena triple formada por los dos segmentos del bucle central II y por el fragmento del bucle III (Tsetlin, 1999).

Se ha demostrado que los miembros de ambos grupos (PLA_2 y 3FTx) actúan sobre la placa terminal neuromuscular, ya sea evitando la liberación presináptica del neurotransmisor acetilcolina, como en el caso de algunas fosfolipasas (β -neurotoxinas), o bloqueando su unión al receptor postsináptico (α -neurotoxinas) que impide la contracción muscular (Bénard-Valle et al., 2014). Es decir, los venenos contienen proteínas tóxicas que a menudo se dirigen al sistema neuromuscular (neurotóxicos), pero las PLA_2 presentan una o más actividades tóxicas, tales como miotoxicidad, citotoxicidad, neurotoxicidad, actividad anticoagulante y efectos hipotensores, así como cardiotoxicidad en el caso de toxinas de tres dedos.

Se tiene bien establecido que las toxinas polipeptídicas de cadena corta tienen una alta especificidad farmacológica de acción moduladora o bloqueante hacia canales iónicos. Por consiguiente, para este proyecto se estudiaron 6 especies del género *Micrurus*, las cuales se describen en la **Tabla 1**. Con información de The IUCN Red List of Threatened Species (2017) y The Reptile Data Base (2017).

Las serpientes de coral se han descrito por su importancia médica. En México, las de mayor importancia son *Micrurus fulvius*, *M. diastema*, *M. distans* y *M. laticollaris* (Bolaños et al., 1978; Kitchens and Ven Mierop, 1987; Tanaka et al., 2010).

Tabla 1. Información sobre las especies de *Micrurus*, de las cuales se estudiaron fracciones de su veneno. IUCN - *The International Union for Conservation of Nature* (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). LC - *least concern* (menor preocupación).

Especie	Foto	Distribución	IUCN
<i>Micrurus surinamensis</i>	<p>CUVIER, 1817</p>  <p>Foto por: J. Maldonado y A. Quevedo en The Reptile Data Base (2017).</p>	<p>Guyana Francesa, Guyana, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Bolivia.</p>	N
<i>Micrurus latifasciatus</i>	<p>SCHMIDT, 1933</p>  <p>Foto en: http://serpientes-snakes.com.ar.elsevier.com/superfamilias/micrurus_latifasciatus_foto.ht</p>	<p>En México en la vertiente del Pacífico, desde el sureste de Oaxaca y el sureste de Chiapas, y al este de Guatemala. 300 a 1280 msnm.</p>	LC
<i>Micrurus tener</i>	<p>BAIRD & GIRARD, 1853</p>  <p>Foto por: William L., 2007 en The Reptile Data Base (2017).</p>	<p>USA (SW Arkansas and Louisiana to WC Texas) y México (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas). 2 000 msnm. (Dundee y Rossman 1989, Trauth et al., 2004).</p>	LC
<i>Micrurus laticollaris</i>	<p>PETERS, 1870</p>  <p>Foto por: Alejandro Mijangos Betanzos, 2010 en iNaturalist.org</p>	<p>Esta especie es endémica de México. En cuencas del Río de las Balsas y Río Tepalcatepec en Michoacán, Guerrero, Jalisco, Morelos, Puebla y Oaxaca. 300 a 1 800 msnm.</p>	LC

<i>Micrurus diastema</i>	DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854	 <p>Foto por: Chris Harrison, 2017 en iNaturalist.org</p>	Cuenca del Atlántico desde el centro de Veracruz, Oaxaca y Yucatán. Tabasco y Chiapas. 1.800 msnm. (Wilson y Johnson 2010).	LC
<i>Micrurus distans</i>	KENNICOTT, 1860	 <p>Foto por: Miguel Ángel L. Cuéllar, 2017 en iNaturalist.org</p>	En México Chihuahua y el sur de Sonora, al sur de la cuenca del pacífico hasta Guerrero 2 200 msnm (Vázquez y Quintero 2005).	LC

Antecedentes

La primera subunidad de CatSper, CatSper 1, fue descrita en 2001 por Ren y colaboradores, se encontró exclusivamente en los espermatozoides y es esencial para la fertilidad masculina (Ren et al., 2001). El CatSper1 se detectó durante una búsqueda de la homología de secuencias de canales selectivos a Ca^{2+} dependientes del voltaje. Posteriormente, se afirmó que las subunidades alfa formadoras del poro del canal CatSper tienen alta homología con los canales selectivos de Ca^{2+} , con la más alta homología en la subunidad CatSper1.

En el 2001, Quill y colaboradores, también describieron a CatSper como un canal iónico permeable a calcio, dependiente de voltaje, sensible al pH y expresado exclusivamente en los testículos y en el espermatozoide.

Las proteínas CatSper sólo se expresan en células germinales masculinas y se localizan en la pieza principal del flagelo en espermatozoides maduros. La implicación de los canales CatSper en la RA inducida por Pg y la astenozoospermia pueden abrir nuevos escenarios tanto para el tratamiento de la infertilidad masculina, así como para fines anticonceptivos (Carlson et al., 2005, Jin et al., 2007).

Anteriormente se pensaba que los estímulos fisiológicos como la zona pelúcida y los nucleótidos cíclicos actuaban sobre los canales Ca(v) , ahora se sabe que CatSper es el canal iónico permeable a Ca^{2+} en el espermatozoide de mamífero, necesario para la entrada de Ca^{2+} durante la capacitación y tiene una función definida en la hiperactivación, haciéndolo esencial para la fertilidad masculina (Ren y Xia, 2010).

CatSper es una molécula heteromultimérica, compuesta por cuatro subunidades α (alfa) formadoras del poro conductor de Ca^{2+} (CatSper 1-4) y cuatro subunidades adicionales auxiliares: CatSper β (beta), CatSper γ (gamma) y CatSper Δ (delta) y CatSper ϵ (épsilon), las cuales, tienen una gran región extracelular con uno o dos dominios transmembranales. La quinta proteína auxiliar, CstSper ζ (zeta), es un pequeño andamio intracelular que ayuda a ensamblar el complejo en su totalidad (Chung et al., 2017).

Los canales pueden activarse elevando el pH_i (Kirichok et al., 2006). Los ratones machos genéticamente nulos para CatSper-1, -2, -3 ó -4 son infértiles y la infertilidad se ha correlacionado con un fracaso en la hiperactivación (Ren et al., 2001; Jin et al., 2007, Qi et al., 2007).

Una imagen ejemplo del canal CatSper, se muestra en la **Figura 3**. La activación de CatSper se produce por un aumento en el pH_i , lo que permite que los iones de calcio entren al citoplasma flagelar del espermatozoide. El equilibrio del calcio en el interior del flagelo se mantiene por medio de bombas dependientes de adenosin trifosfato (ATP), las cuales exportan iones de Ca^{2+} intracelulares e importan protones extracelulares.

La acidificación resultante se regula mediante la extrusión de protones por vía del canal de H^+ dependiente del voltaje tipo 1 (Hv1) (Singh y Rajender 2015). Se considera que Hv1 es responsable de la alcalinización intracelular que implica la extrusión de H^+ del espermatozoide (Lishko et al., 2012). En los espermatozoides humanos, Hv1 se localiza dentro de la pieza principal, revelando su importancia en la regulación del pH dependiente de CatSper.

El canal iónico CatSper, se activa directamente por progesterona, el agonista mejor caracterizado en el espermatozoide de humano. Esta hormona estimula una respuesta bifásica que comprende una fase transitoria inicial y subsiguientemente una sostenida. La progesterona y las prostaglandinas, son hormonas femeninas que estimulan el influjo de Ca^{2+} . Otros factores, incluyendo neurotransmisores y quimiocinas también afectan la función espermática cambiando la concentración de Ca^{2+} (Brenker et al., 2012).

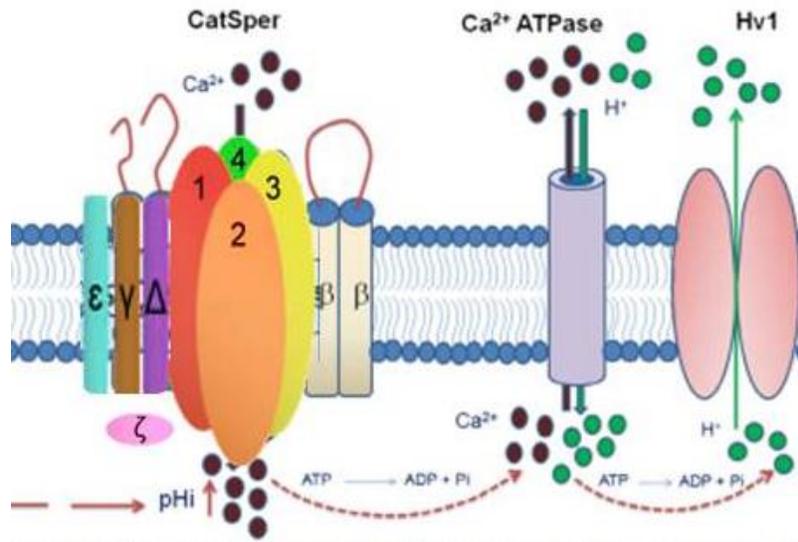


Figura 3. Funcionamiento y regulación del canal *CatSper*. Imagen tomada y modificada de Singh y Rajender 2015.

La progesterona se une a un receptor no identificado en la membrana plasmática del espermatozoide, provocando un rápido aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , este aumento inducido por progesterona depende del Ca^{2+} extracelular, aunque puede estar involucrada la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares. Se cree que los espermatozoides de mamíferos tienen al menos dos depósitos de Ca^{2+} , el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (RNE). La calreticulina, una proteína de unión a Ca^{2+} encontrada generalmente en los depósitos de Ca^{2+} y el trifosfato de inositol (IP3) se detectaron en estos dos almacenes en espermatozoides de diversas especies de mamíferos (Darszon et al., 2011).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) potencian el aumento transitorio del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por Pg en los espermatozoides no capacitados y un antagonista de la proteína quinasa A (PKA) inhibe la respuesta, lo que sugiere que la fosforilación dependiente de la PKA regula positivamente la cascada de señalización de la progesterona. Por el contrario, un inhibidor del fosfolipasa C (PLC), U73122, no afecta el aumento inducido por progesterona en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que indica que la PLC no está implicada en la cascada de señalización. Sin embargo, se ha informado que la progesterona estimula la activación de PLC y la producción de IP3 (Darszon et al., 2011).

El tratamiento con progesterona en las membranas espermáticas aumenta la unión a GTPγS, lo que sugiere que activa una proteína G. Además han aparecido varios receptores de membrana candidatos para progesterona, incluyendo un nuevo receptor de progestina (mPR) acoplado a proteína G. Por lo tanto, varios ligandos, en particular odorantes, se han propuesto para controlar la entrada y el intercambio de Ca^{2+} a través de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) y las vías de señalización del adenosin monofosfato cíclico (AMPC).

Los análogos de nucleótidos cíclicos permeables a la membrana se han utilizado con frecuencia para estudiar la señalización mediada por AMPC, la cual también activa CatSper directamente a través de un sitio extracelular. Se demostró que el complejo del canal CatSper puede responder a diversas sustancias químicas, por lo que funciona como un sensor polimodal para múltiples señales químicas, ayudando a los espermatozoides durante su viaje a través del tracto genital femenino (Brenker et al., 2012).

Estudios de Brenker et al. (2012) describen que probablemente la adenosina inhibe la actividad de fosfodiesterasas (PDE), y por lo tanto, eleva el AMPC. El SQ22536, un inhibidor de adenil ciclasa transmembranal (TmAC), aumenta los niveles de AMPC. Otro inhibidor de TmAC, el MDL12330a, bloquea canales CatSper.

A pH 8, se activa una fracción significativa de canales CatSper y con progesterona (1 μM) mejoran aún más las corrientes de cola de Ba^{2+} , sin embargo, el NNC55-0396 (10 μM) inhibió estas corrientes de cola. El bloqueo por NNC55-0396 demuestra que el pH alcalino, progesterona y prostaglandina E1 (PGE1) activan CatSper. Se registraron las corrientes de CatSper evocadas con progesterona utilizando soluciones intracelulares sin ATP y guanosin trifosfato (GTP), lo que objeta un mecanismo de activación que implique segundos mensajeros, fosforilación o proteínas G. Aquí, los mismos autores, mostraron que en el espermatozoide humano la progesterona activa CatSper, ya sea por unión al propio canal o a una proteína asociada. Basándose en el análisis electrofisiológico de las corrientes inducidas por progesterona en espermatozoides aislados, Lishko et al., 2011 llegaron a una conclusión similar (Strünker et al., 2011).

En el 2014, Tamburrino y colaboradores redescubrieron los efectos inhibitorios del NNC55-0396 (10 μM) y el mibefradil (30 μM) sobre espermatozoides, reduciendo el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, los estimulados por Pg se reducen significativamente por ambos inhibidores.

Strünker y colaboradores (2011) concluyeron que CatSper representa un canal de Ca^{2+} bloqueado por un ligando que puede ser activado por compuestos lipofílicos. Aunque el sitio de unión para la progesterona aún no se ha determinado, no se excluye la posibilidad de que la progesterona se una a proteínas tales como los mPRs y/o PGRMCs, las cuales podrían asociarse con CatSper y fungir como enlace al canal. Alternativamente, las subunidades accesorias CatSper β o CatSper γ podrían alojar el sitio de unión. La disponibilidad de bloqueadores CatSper proporciona una poderosa herramienta para establecer inequívocamente a la progesterona como un quimioattractor y a CatSper como un canal de traductor de quimiotaxis, pero también para interferir farmacológicamente con la fertilización.

Compuestos químicos sintéticos que alteran la función endocrina (SAE), presentes en alimentos y productos de cuidado personal, están implicados de diversas formas en la reproducción humana, incluyendo la infertilidad. Schiffer (2014), demostró que estructuralmente diversos SAE activan el canal CatSper e interfieren con varias funciones del espermatozoide y, por tanto, pudieran perjudicar la fertilización humana. Los SAE en fluidos reproductivos podrían perturbar la secuencia precisa de los eventos coordinados subyacentes de la fertilización, como evocar respuestas de la motilidad y la reacción del acrosomal en el momento y el lugar equivocado; por otra parte, la desensibilización de los espermatozoides a los factores femeninos podría obstaculizar la navegación y la penetración en el óvulo.

Bloqueadores de CatSper, como el HC-056456, impiden la motilidad por hiperactivación, produciendo resultados similares en espermatozoides de ratón genéticamente nulos para CatSper. Este bloqueador abre un camino para el desarrollo de una nueva clase de anticonceptivos dirigidos a la actividad del canal (Carlson et al., 2009). Una idea de anticoncepción inmunológica se desarrolló cuando se evaluó la acción de anticuerpos anti-CatSper1 inmunoglobulina G en espermatozoides, lo que redujo significativamente el porcentaje de células con motilidad progresiva y la tasa de fertilización (Singh y Rajender, 2015).

Por todo lo anterior, el canal de Catsper ha sido implicado como un blanco molecular potencial con el objetivo de la anticoncepción y hay una cierta cantidad de potentes bloqueadores de canales Catsper para la anticoncepción, como HC-056456, NNC55-0396, entre otros.

Por otro lado, se han realizado varios estudios sobre el veneno de serpientes coralillo mexicanas. Por ejemplo, Possani y colaboradores (1979) publicaron la purificación y caracterización de una fosfolipasa del veneno de la serpiente coral mexicana, *Micrurus fulvius microgalbicus* y aislaron cinco fracciones, una de ellas tenía 98% de la actividad total de la fosfolipasa. El análisis de su secuencia primaria reveló la presencia de 119 residuos de aminoácidos.

En 2014 Bénard-Valle et al., identificaron los componentes del veneno de *M. tener* a través de la caracterización bioquímica de sus componentes y se concluyó que la gran diversidad y abundancia de las fracciones letales observadas no son las únicas fracciones tóxicas pertinentes dentro el veneno.

Las toxinas de “Tres Dedos” en elápidos tienen una configuración molecular plegable, con cuatro disulfuros en un núcleo globular, de los cuales emergen tres bucles ricos en láminas β . Las toxinas de 60/62 residuos son consideradas como toxinas de cadena corta. En elápidos, esta estructura de cadena corta ha sido incorporada para producir toxinas que interactúan con el AchR, la acetilcolinesterasa y canales de Ca^{2+} tipo L (Alape-Girón et al., 1999).

La transmisión neuromuscular parece ser el principal blanco de las proteínas contenidas en el veneno de los elápidos. El de *Micrurus* se caracteriza por bloquear la función neuromuscular del receptor nicotínico de la acetil colina (nAChR), aunque el veneno de algunas especies también afecta la funcionalidad de la terminal presináptica de la unión neuromuscular. Estos potentes poliaminoácidos peptídicos conocidos como alfa-neurotoxinas impiden la contracción muscular (Carbajal-Saucedo et al., 2013).

Esta interacción se debe en parte a la presencia de residuos cargados positivamente en el segundo bucle, los cuales juegan un papel importante en la activación de nAChR, además, los residuos tales como Gln7, Ser8 y Gln10 del bucle I en la cadena corta de erabutoxina-a están implicados en el reconocimiento del receptor (Trémeau et al., 1995).

Las toxinas de tres dedos incluyen a las cardiotoxinas (CTX). En estudios experimentales, se ha encontrado comúnmente que la inserción de CTX y su especificidad funcional se determinan por las propiedades estructurales e hidrofóbicas de los bucles de tres dedos (Kumar et al., 1997). Además, se han publicado varios estudios de modelos moleculares exitosos de interacciones entre hélices e interfaz de membrana (Efremov, et al., 2002).

Justificación

El descubrimiento, estudio y aplicación de bloqueadores de CatSper, provenientes de fracciones polipeptídicas (constituyentes de venenos) que deterioren las actividades fisiológicas normales de los espermatozoides de humano, ayudaría a identificar agentes farmacológicos como base para un futuro contraceptivo masculino.

Las fracciones polipeptídicas con características de potencia y selectividad farmacológicas contenidas en el veneno de diversos organismos, por ejemplo, serpientes, alacranes, arañas, insectos, gasterópodos (conos de mar), entre otros; son un recurso de origen natural y con gran potencial para su aplicación en diversas áreas de las industrias farmacéutica, biomédica y biotecnológica. Por lo anterior, es necesario hacer estudios de ciencia básica, que permitan descubrir e identificar estas fracciones tóxicas que puedan significar beneficios.

De esta manera, este trabajo señalaría la importancia de las posibles aplicaciones de venenos, pero además y de manera recíproca, el conocer la utilidad de las especies también constituye un argumento para la conservación de la vida silvestre, más aun de los organismos de donde provienen dichos venenos y sus ecosistemas. Lo anterior adquiere mayor relevancia considerando que en nuestro país contamos con una alta diversidad de animales venenosos, los cuales muchas veces son vistos como un peligro para los seres humanos y que por diversas causas se encuentran amenazados o incluso en riesgo de extinción. Las fracciones polipeptídicas utilizadas en esta tesis provienen de varias especies del género *Micrurus*, las cuales tienen una amplia distribución en México.

Por otro lado, si se lograra contar con un anticonceptivo enfocado al sexo masculino generaría importantes beneficios, tales como una responsable planeación familiar, o bien, la decisión de no procrear. La responsabilidad del control natal no recaería solo en la mujer y ésta adquiriría beneficios tales como evitar molestias por el uso de anticonceptivos y/o no aumentar la probabilidad de contraer cáncer, problemas hormonales e infertilidad, principalmente. Además, a nivel mundial, la importancia de un control natal eficiente, ayudaría a disminuir el crecimiento de la población mundial con el fin de evitar la escasez y el deterioro de los recursos naturales del planeta.

Hipótesis

Dada la alta afinidad, potencia, selectividad e incluso especificidad farmacológicas de un vasto número de toxinas polipeptídicas provenientes de venenos animales, sobre canales iónicos de la membrana plasmática, es posible identificar, a partir de una vasta biblioteca de distintas fracciones polipeptídicas del veneno de *Micrurus*, a aquella(s) con actividad inhibitoria sobre el canal iónico CatSper, específico de espermatozoides de humano.

Objetivos

General

- § Encontrar inhibidores del canal CatSper, exclusivo del espermatozoide de humano, probando la acción específica de un número apreciablemente amplio de distintas fracciones polipeptídicas de venenos, extraídos de serpientes del género *Micrurus*, mediante un ensayo biofarmacológico funcional. Contándose así con un agente farmacológico que pudiese constituir la base química para el futuro desarrollo de un posible anticonceptivo masculino.

Particulares

- § Estandarizar las condiciones experimentales para evaluar la acción de fracciones polipeptídicas de venenos de *Micrurus*, en espermatozoides de humano.
- § Tamizaje de fracciones tóxicas extraídas de distintas especies del género *Micrurus*. Mediante la evaluación del cambio transitorio en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) de espermatozoides de humano, inducido por Pg y en respuesta a la presencia de las fracciones polipeptídicas, identificando aquellas fracciones inhibitoras del influjo de Ca^{2+} a través del canal iónico CatSper.
- § Medir el cambio en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) de espermatozoides de humano, incubados solo con fracciones polipeptídicas, por medio de equipos automatizados de fluorescencia.

Materiales y Método

1. Reactivos

El medio de cultivo: F-10 HAM, Progesterona, Cloruro de Calcio (CaCl_2) y Poly-L-lisina se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich. La ionomicina (Ionomycin) se obtuvo de Alomone Labs. El Mibefradil y Fluo4-AM se consiguieron de Molecular Probes.

Las placas de 96 pozos se compraron de BRAND (**Figura 4**). Las puntas de pipetas estériles de 200 μl para el FlexStation 3 se adquirieron de Molecular Devices. Cámara Makler, counting chamber se adquirió de New York Microscope Company Inc.

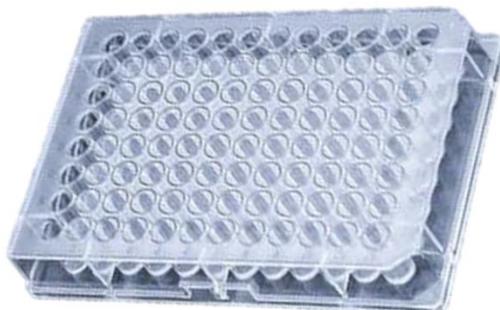


Figura 4. Placa de 96 pozos (BRAND) transparente de fondo plano.

2. Medios celulares y uso

Medio no capacitante: Ham's F-10 con la adición de CaCl_2 (2 μM). Solución empleada para que las células no adquieran una hiperactivación (Torres, 2013).

Medio de Registro Humano (MRH) a pH 7.4: Solución empleada como buffer y en la cual se mantuvieron los espermatozoides para su registro en el FlexStation 3 (Torres, 2013). Ver **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición de la solución de Medio de Registro Humano (MRH).

Compuesto	mM
D-Glucosa	5
Hepes	20
KCl	4
Lactato de sodio	10
MgCl	1

NaCl	120
NaHCO ₃	25
Piruvato de sodio	1
CaCl ₂	2

La medición del cambio en la concentración de Ca²⁺ intracelular se hizo empleando Fluo 4-AM, colorante fluorescente sensible a Ca²⁺, con el cual se hizo una solución madre a 1 mM en Dimetil Sulfoxido (DMSO) usado como disolvente orgánico. Se elaboraron alícuotas de Fluo4-AM que se colocan en tubos Ependorff y donde posteriormente se agregan los espermatozoides para tener una concentración final en el ensayo de 1µM.

Con el fin de lograr una adherencia firme de los espermatozoides al fondo de las placas, éstas se trataron con Poly-L-lisina, la cual se preparó en una relación volumen a volumen (v/v) a una concentración de 0.01% en agua desionizada. Con una pipeta multicanal se tomaron 60 µl de la solución y se colocaron en cada pozo de la placa. Después de 5 min se retiró por completo y enjuagó con MRH dos veces (Loza A., 2015 - no publicado)

La Ionomicina utilizada para incrementar específicamente la permeabilidad de la membrana celular al calcio iónico extracelular (Suárez, 2008), se usó a una concentración final de 10µM/µl.

La Progesterona (Pg), compuesto sintetizado de la hormona producida por el cuerpo lúteo (Darszon et al., 2011), fue usada como el control negativo. Se llegó a una concentración final de 4 µM/µl.

La solución de Mibefradil fue evaluado a una concentración de 40µM. El Mibefradil es un bloqueador de los canales de calcio dependientes de alto voltaje (Tamburrino et al., 2014) por lo que se empleó como el control positivo.

3. Muestras Biológicas

Para este trabajo se evaluaron 61 fracciones polipeptídicas de serpientes del género *Micrurus*, las cuales se obtuvieron de una biblioteca desarrollada en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, constituida por aproximadamente 950 diferentes fracciones, éstas fueron aisladas mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC, siguiendo su acrónimo en inglés) por el Biol. H. Cardoso Torres. El gran total de estas fracciones se aisló de venenos procedentes de distintas especies de tarántulas, alacranes y serpientes, todos ellos provenientes de los laboratorios de los Dres. Lourival Possani, Alejandro Alagón y Gerardo Corzo, los tres del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

Cada fracción se llevó a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, posteriormente se diluyeron en una relación 1:10 (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y al agregar a la muestra 50 μl de MRH con espermatozoides queda a 1 μg por condición. Para los experimentos evaluadores de la posible relación dosis-efecto se hicieron soluciones madre (“stocks”) a 1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, pero cuando el volumen final correspondía a 150 μl (50 μl de espermatozoides, 50 μl de MRH y 50 μl de fracción polipeptídica) las concentraciones fueron de 0.014 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.7×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.7×10^{-4} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.7×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.7×10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 6.7×10^{-7} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, correspondiente a cada disolución.

Las muestras de espermatozoides de humano se obtuvieron de donantes masculinos dentro del intervalo de 18 a 30 años de edad, mediante eyaculación por masturbación. El semen se recolectó por el propio donante en frascos de plástico estériles. A todos los donantes se les instruyó y requirió guardar abstinencia sexual de al menos 48 horas antes de la obtención de la muestra, así como una dieta balanceada y libre de fármacos. La evaluación se realizó siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2010, donde indica que el valor normal es de 15 millones por cada ml eyaculado o 39 millones en la totalidad de la muestra.

Las muestras se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante 30 min, con el fin de que la muestra perdiese viscosidad y se licúe. Posteriormente se colocaron 600 μL de la muestra en diferentes tubos de ensayo. Para separar los espermatozoides del líquido seminal se usó la técnica de “swim-up” (nado hacia arriba), agregándosele por goteo 1 ml de medio no capacitante. A cada tubo se le posicionó de manera inclinada en una gradilla (con el fin de aumentar la superficie en que los espermatozoides estén en contacto y que la mayor cantidad posible de ellos nade hacia arriba alcanzando el medio) (Mata-Martinez et. al., 2013).

Posteriormente la muestra se colocó nuevamente en la incubadora por una hora, para recuperar solo aquellos espermatozoides vivos y aptos para responder a progesterona. Finalmente se recuperan los primeros 800 μL que contienen ahora espermatozoides móviles de la fase superior de la muestra y se colocaron en un solo tubo Falcón.

Se tomaron 10 μL de la suspensión de espermatozoides en una cámara de Mackler para cuantificar la concentración de millones de células por mililitro. En el microscopio óptico se observaron y contaron 3 distintas filas para hacer el promedio de estas.

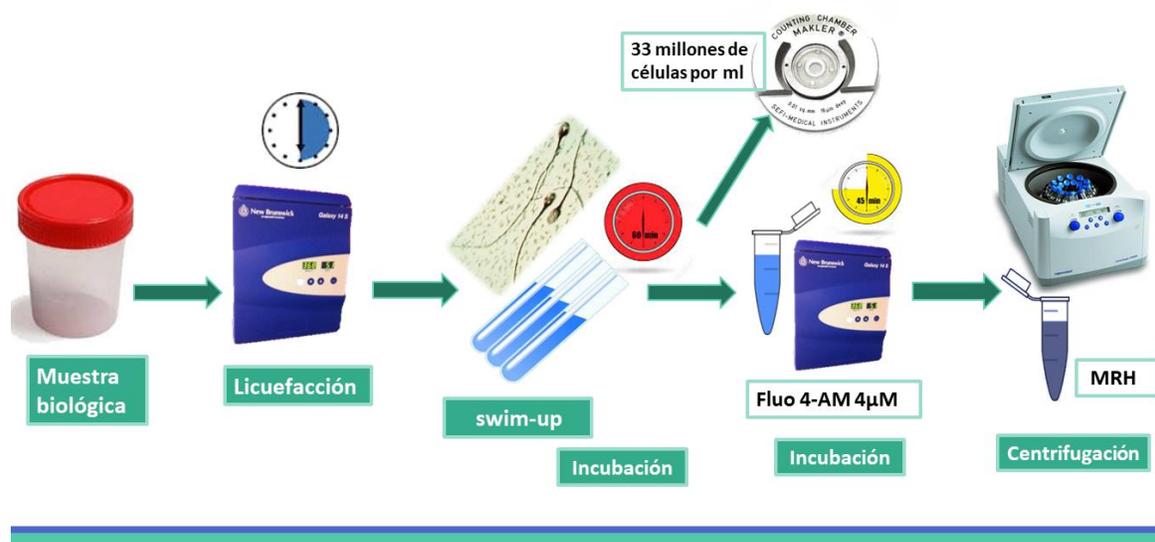


Figura 5. Ilustración gráfica de preparación de la muestra.

De la muestra recuperada de espermatozoides se tomó 1 ml y se agregó a la alícuota de Fluo-4AM (4µM) a fin de cargar las células con el fluoróforo durante 45 minutos en la incubadora. Posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 650xg (fuerza centrífuga). Al terminar la centrifugación, se extraen y desechan 980 µl del sobrenadante, evitando alterar el “pellet”, para inmediatamente agregar 820 µl de MRH y resuspender los espermatozoides (33 millones de células por ml aproximadamente). Este proceso fue repetido para cada ml de espermatozoides. La **Figura 5** ilustra la secuencia metodológica empleada hasta este punto.

El FlexStation 3 fue usado para evaluar por fluorescencia los cambios en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) inducidos por la incubación con la toxina en los espermatozoides ($\sim 3 \times 10^6$ células por pozo). Se pegaron 50 µl de células en cada pozo de la placa, seguido de 50 µl de MRH y se introdujo a la platina correspondiente en el equipo.

El equipo se programó y este registró la intensidad de fluorescencia basal durante 30 segundos, posteriormente el equipo agregó la toxina o controles (MRH ó Mibefradil 40µM) a la concentración deseada monitoreando los cambios durante 5 min. Finalmente, agregó la Ionomicina (10 µM) para obtener el máximo de fluorescencia y así normalizar los registros para poder comparar entre donadores. Este ensayo siempre se realizó por duplicado para cada fracción polipeptídica evaluada en cada donador (**Figura 6 b**).

Para la medición del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$, inducidos por la Pg y en respuesta a la presencia de las fracciones polipeptídicas en los espermatozoides ($\sim 3 \times 10^6$ células por pozo); se pegaron 50 μ l de células en cada pozo de la placa, seguido de 50 μ l de MRH. Posteriormente se incubó la primera columna de la placa con 50 μ l de una fracción diferente por pozo o un control durante 4 minutos, pasados los 4 minutos, se procedió con la siguiente columna.

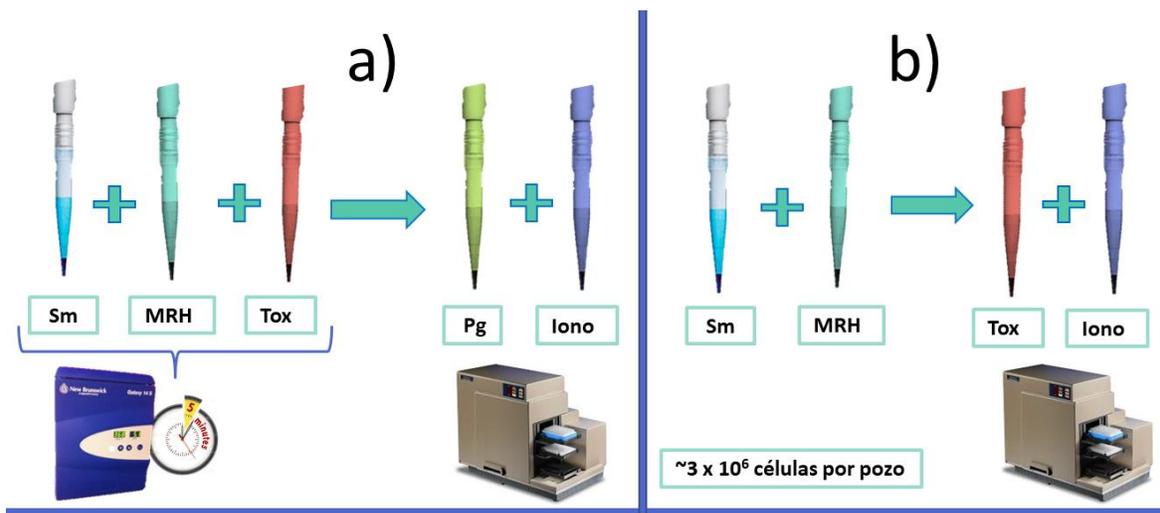


Figura 6. a) Experimento para medir cambios en $[Ca^{2+}]_i$, inducido por Pg. **b)** Experimento para medir cambios en $[Ca^{2+}]_i$ basal. Sm- muestra de espermatozoides. MRH- Medio de Registro Humano. Tox- fracción polipeptídica. Pg- Progesterona. Iono- Ionomicina. La flecha indica que las siguientes adiciones son hechas por el FlexStation 3.

La placa se introdujo en la platina correspondiente en el equipo, el equipo se programó y este registró la intensidad de fluorescencia basal durante 30 segundos, posteriormente el equipo agregó automáticamente la progesterona (4 μ M/ μ l) y monitoreo los cambios por 260 segundos. Finalmente, agregó la ionomicina (10 μ M) para obtener el máximo de fluorescencia (**Figura 6 a**).

4. Equipo Instrumental

4.1 FlexStation 3

El FlexStation 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) es un lector multimodal de microplacas automatizado y programable. El equipo registra señales ópticas en cinco modos de detección: absorbancia, intensidad de fluorescencia, polarización de fluorescencia, luminiscencia y resolución temporal (cinética) de fluorescencia. En este estudio se utilizó la modalidad Flex, ya que mide en tiempo real la intensidad de fluorescencia.

El instrumento contiene un complejo y avanzado sistema óptico habilitando el registro óptico por arriba y debajo de las microplacas, las cuales pueden ser de 96 o 384 pozos. Además, efectúa el manejo programable y perfectamente sincronizado de líquidos para ejecutar ensayos bioquímicos, así como aquellos basados en células vivas. Este equipo registra una amplia variedad de longitudes de onda de excitación y emisión, óptimas para los requerimientos del ensayo bajo estudio (**Figura 7**).

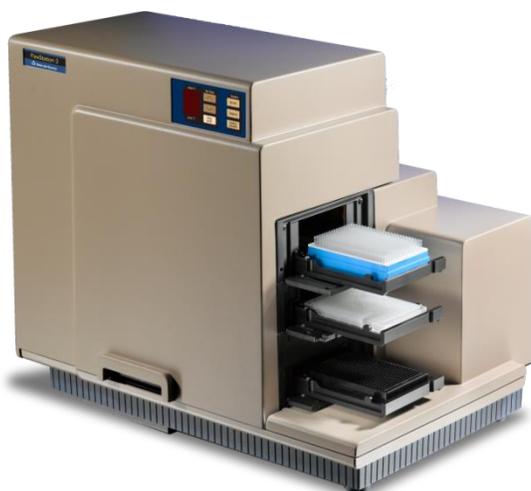


Figura 7. Esquema del equipo FlexStation 3.
Tomada de MolecularDevices 2017.

Para la adquisición y análisis de datos se emplea un paquete de software llamado SoftMax[®] Pro (también de Molecular Devices), el cual puede programar un protocolo dado, modificado y adaptado para cada ensayo específico. En este trabajo se usaron dos distintos protocolos descritos más adelante.

4.2 Protocolo

Las placas de 96 pozos procesadas previamente y llenadas con los compuestos correspondientes se colocan para la lectura de la cinética de la intensidad de fluorescencia en el lector de placas FlexStation3 y se utiliza su programa de control y análisis SoftMax Pro (Molecular Devices) de acuerdo al siguiente procedimiento general, basado en Multi-Mode Microplate Reader User Guide (2013) e ilustrado en la **Figura 8**:

1. Las lecturas de intensidad de fluorescencia se reportan en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU), seleccionando las longitudes de onda 488 nm y 515 nm, para la Excitación y la Emisión, respectivamente.

- Se utilizó la sensibilidad Normal para el tipo de lectura y Alta sensibilidad para el Tubo Fotomultiplicador (PMT).
- Los tiempos de lectura para las determinaciones de los ensayos, con cada fracción polipeptídica a ser probada y con adición de progesterona fueron de 450 y 375 segundos (s), respectivamente. En ambos casos el intervalo de lectura (tasa de lectura) fue de cada 2 segundos.
- En el tipo de microplaca ("Assay Plate Type") para las condiciones de lectura del instrumento se usó "96 Wells Constar Clear".
- Del total de las 12 columnas de cada microplaca se leyeron de dos en dos, para tener duplicados de cada condición.

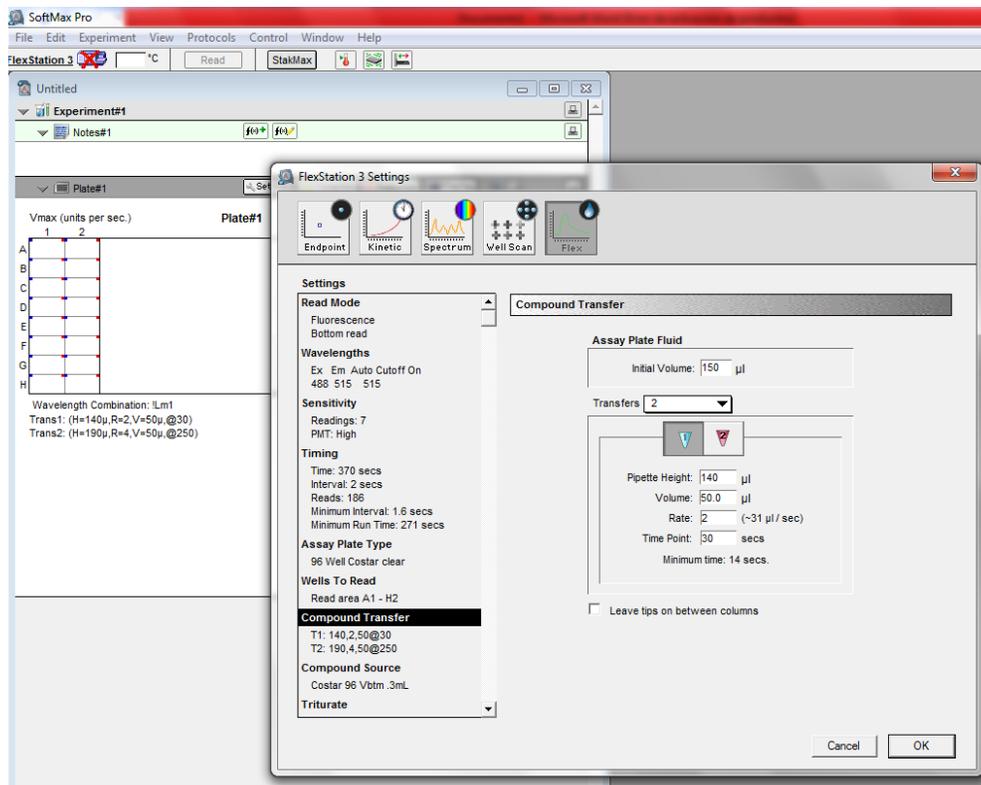


Figura 8. Copia de la imagen de la pantalla proyectada por el programa SoftMax Pro. Se muestra la configuración de las condiciones y los parámetros seleccionados para la adición de volúmenes.

- Por último, se seleccionaron los parámetros y condiciones para el agregado de los compuestos. Para la respuesta a la fracción por sí sola, la primera adición fue de la fracción a ser probada y la segunda adición fue de lonomicina. Para la repuesta a progesterona la primera adición fue de la progesterona y la segunda de lonomicina.

7. Siempre se tuvo particular cuidado en programar apropiadamente la altura a la que la pipeta vaciara la solución ("Pipette Height", 140 μ L, para un volumen inicial de 50 μ L agregados previamente al pozo), el volumen que vaciara en μ l ("Volume", 50 μ L), la tasa de vaciado "Rate=2" (31 μ L por segundo) y el tiempo (Time Point, 30 segundos).
8. Al oprimir el comando de inicio de ejecución del experimento aparece un resumen de todos los comandos seleccionados y descritos en los puntos anteriores (**Figura 9**).
9. Durante la ejecución de los ensayos, el lector de microplacas FlexStation 3 muestra una pantalla con el curso temporal (cinética), en tiempo real, de los valores de fluorescencia medidos para cada pozo. Ejemplos de esto se muestran en las **Figuras 10 y 11**.
10. Al terminar el experimento los datos son exportados en formato de texto para su análisis posterior.

FLEX
Time: 370 secs
Interval: 2 secs
Reads: 186
Fluorescence
Bottom read
Ex Em Cutoff*
Lm1 488 515 515
*Auto Cutoff
Automix: Off
Calibrate: On
PMT: High
Settle Time: Off
Reads/Well: 7
Lag Time: 0
End Time: 370
RFU Min: 0
RFU Max: 20000
Vmax Pts: 186/186

Plate Last Read:
No Data

Figura 9. Resumen de la configuración de los parámetros del programa SoftMax Pro seleccionados para la ejecución de los ensayos experimentales de esta tesis.

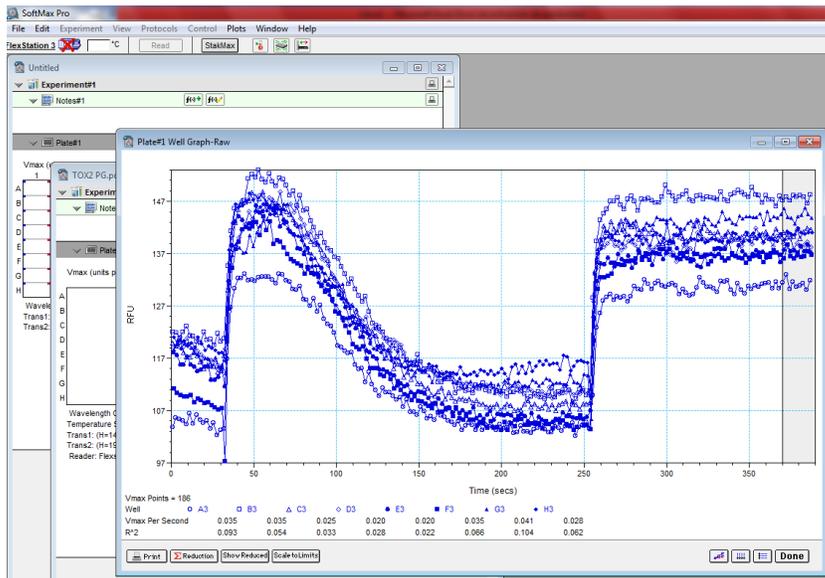


Figura 10. Ejemplo de lectura de la cinética experimental del ensayo de respuesta a la Progesterona. Después de 30 segundos se efectúa la primera adición. El cambio sostenido al final de los registros corresponde a la adición (a los 260 segundos) de la Ionomicina.

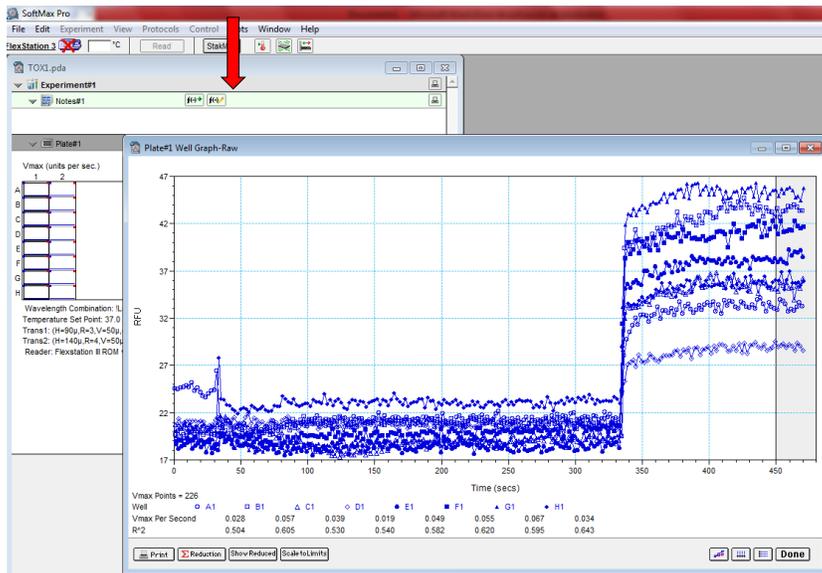


Figura 11. Ejemplo de lectura de la cinética experimental del ensayo de respuesta a solamente la fracción polipeptídica. Después de 30 segundos se efectúa la primera adición (nótese el artefacto en el registro producido por la adición del volumen).

5. Análisis estadístico

Se utilizó el programa DrugSearchWare (Pérez-Ortega y Picones, 2016). Este programa importa los archivos que el programa SoftMax Pro exporta en formato de texto (*.txt).

El programa DrugSearchWare analiza cuantitativamente los resultados numéricos de cada experimento, a manera de comparar los efectos de cada uno de los compuestos probados en esta tesis. Inicialmente ajusta los registros haciéndolos partir del nivel cero en el eje de las ordenadas (RFU). Una vez llevados al nivel cero, cada registro se normaliza. La normalización de los datos numéricos se hizo tomando la respuesta del valor máximo alcanzado durante la exposición a Ionomicina (siempre agregada en la última parte de cada cinética registrada), es decir, como el 100% o máximo de intensidad de fluorescencia.

Ya normalizados los datos, se efectúa el promedio aritmético en ensamble (es decir, punto a punto en el tiempo, “ensemble average”) de aquellos registros correspondientes a condiciones experimentales iguales (repeticiones). En la **Figura 12**, se muestra un ejemplo de las imágenes que el programa DrugSearchWare genera a partir de los datos y con las condiciones que se han señalado anteriormente.

Esta imagen (**Figura 12**) contiene 2 graficas, la gráfica superior **a** muestra la cinética de dos repeticiones en respuesta a la progesterona (obtenidas de dos pozos distintos registrados durante el mismo experimento). Estos trazos ya han sido corregidos para que inicien en el nivel cero del eje vertical y normalizados tomando al valor máximo en respuesta a Ionomicina (>270 s) como el 100%.

En la gráfica **b** se ilustra el promedio en ensamble de los trazos de la gráfica **a**. Las áreas sombreadas corresponden a los intervalos definidos por el usuario. El primero de estos intervalos (de 30 a 120 s) se emplea para calcular el máximo valor y el área bajo la curva de la fase transitoria de la respuesta a la Progesterona. Dentro del segundo intervalo (de 180 a 270 s) se calcula el valor representativo de la fase sostenida de esta misma respuesta fisiológica.

Finalmente, el programa de análisis crea archivos en formato digital “*.xlsx” para proseguir el análisis final utilizando el programa Excel del paquete Office (Microsoft).

El promedio del total de los experimentos en la condición de MRH, Pg y Mibefradil se tomaron como el control global. Para caracterizar el efecto producido por cada fracción probada se tomó el resultado de al menos 3 diferentes donadores (n = 3),

cada muestra contenía de 3 millones de células por ml y a su vez esta se evaluaba por duplicado (dos pozos distintos).

Una vez que se conocieron los promedios de cada condición para las dependencias con la concentración, se realizó una prueba estadística de datos no paramétricos por tres razones: la n es pequeña (de tres y no mayor a 9, para cada ensayo con cada una de las toxinas), esta n varía con la n del control de Pg y los datos son no pareados, ya que son ensayos independientes, es decir, que se aplican por separado a diferentes células.

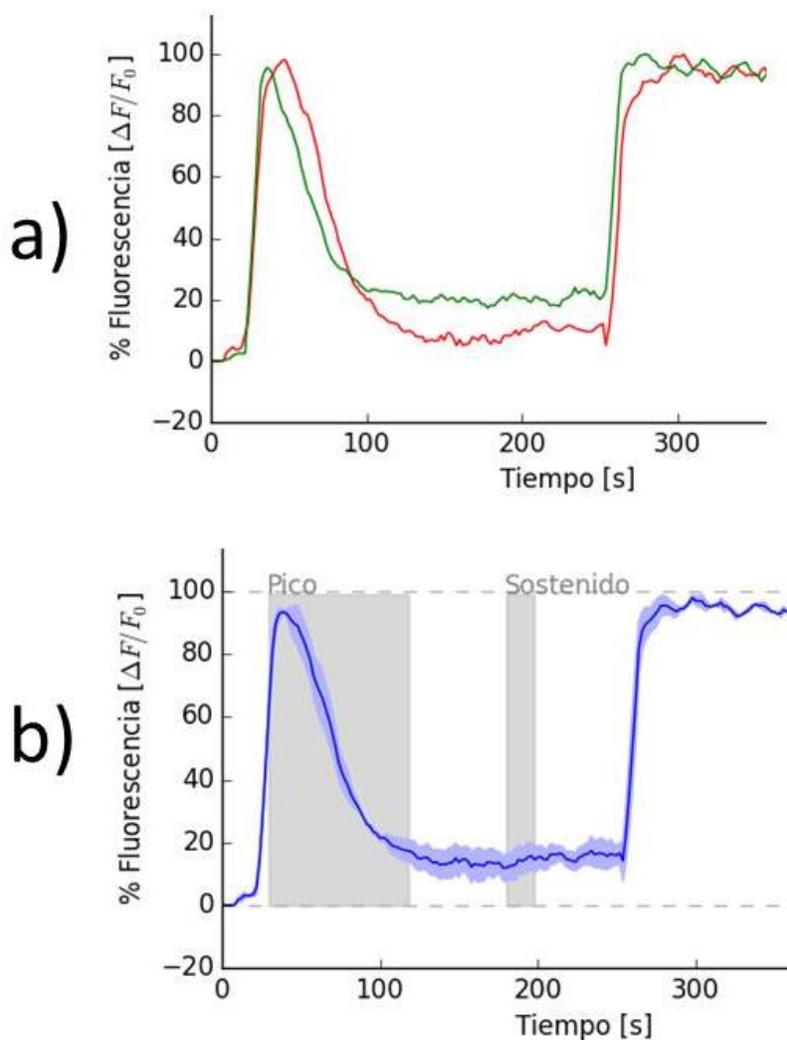


Figura 12. Ejemplo ilustrativo del procedimiento de análisis mediante el programa DrugSearchWare (Pérez-Ortega y Picones, 2016). **a)** Se muestra el valor de la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo, para ambos trazos. **b)** Se muestra el valor de la intensidad de fluorescencia contra el tiempo, con una sola cinética, resultante de promediar los dos trazos anteriores. En esta grafica se dejan ver dos franjas verticales sombreadas: la primera corresponde al intervalo de tiempo donde se calculó el dato más elevado, este corresponderá al valor para inhibición a la Pg; y la segunda franja muestra el intervalo de valores que se promedian para obtener el valor de la fase del sostenido.

Primero se empleó la prueba estadística Kruskal-Wallis, la cual es una prueba no paramétrica que compara los promedios de tres o más grupos. Tiene como objetivos determinar si las diferencias entre los grupos son mayores de lo que se esperaría obtener por azar y determinar el intervalo del 95% de confiabilidad para la existencia de tal diferencia.

Tener un valor de la probabilidad P igual o menor 0.05, evidencia que los promedios de la población son diferentes, incluso si las distribuciones pudiesen superponerse considerablemente. De este modo, si el valor es $P \leq 0.05$, se puede rechazar la idea de que la diferencia se debe a un muestreo aleatorio, y se puede concluir en su lugar que las poblaciones tienen diferentes distribuciones a causa de una variable. Si el valor es $P > 0.05$, los datos no dan ninguna razón para concluir que las distribuciones difieren.

Para saber dónde se encuentra dicha diferencia entre promedios, posteriormente se utilizó la prueba estadística Mann-Whitney. La prueba de Mann-Whitney, también llamada prueba de Suma de Rango, es una prueba no paramétrica que compara dos grupos no apareados. Primero se clasifican todos los valores de bajo a alto, sin prestar atención a qué grupo pertenece cada valor, el número más pequeño obtiene un rango de 1 y el número más grande obtiene un rango de N , donde N es el número total de valores en los dos grupos, posteriormente se suman las filas en cada grupo, e informa de las dos sumas. Si las sumas de las filas son muy diferentes, el valor de P es $P \leq 0.05$, si el valor de P fuese $P > 0.05$, los datos no dan razón para concluir que los promedios generales difieren.

Tabla 3. Extracción de la base de datos empleada para el manejo y análisis de los mismos.

Progesterona 4 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$	<i>Micurus latifasciatus</i> 22.64					
	0.014 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.7×10^3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.7×10^4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.7×10^5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.7×10^6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.7×10^7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0.9284753	0.674138	0.7731705	0.7505575	0.7472332	0.8698279	0.9513869
0.8693618						
0.9053707		0.8990951				0.8676782
1.127821		0.7401212				
0.9284753		0.6644535				
0.9684224		1.077303	1.128793	0.9204214	1.11304	0.9710466
0.950586	0.63546	0.8481685				
0.90491	0.822591	0.8432313	0.8060621	0.8520946	1.084192	
1.072627	0.8265007	0.8595003				1.420422
0.869362		0.9169675		1.059754	1.14018	

Estos análisis se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 6.04 para Windows, GraphPad Software. Para estos resultados, se indica gráficamente la significancia entre el control y el ensayo, por lo que en las siguientes figuras resultantes se pueden apreciar los asteriscos que indican el nivel de significancia.

Los datos fueron ordenados como se muestra en la **Tabla 3**, la cual es parte de la base de datos que se manejó para cada especie y para cada dosis respuesta.

Se partió de las hipótesis donde:

Hipótesis nula (H₀): La respuesta a Pg no se inhibe por las distintas concentraciones de la fracción polipeptídica probada experimentalmente.

Hipótesis alternativa (H_a): La respuesta a Pg cambia, disminuye o no, al aumentar las concentraciones de fracción polipeptídica.

Resultados

1. Cromatograma

Como se ha hecho mención anteriormente, esta tesis se centralizó exclusivamente en aquellas fracciones polipeptídicas provenientes del veneno de 6 distintas especies del género *Micrurus*, conformando un total de 61 diferentes fracciones de veneno (posibles toxinas) analizadas. Se muestra un ejemplo del cromatograma obtenido del veneno de la especie *Micrurus tener*, el nombre de cada fracción polipeptídica se compone por el nombre de la especie seguido por el valor correspondiente al tiempo de retención (TR) obtenido de la separación cromatográfica (cromatograma original), **Figura 13**.

La parte sombreada del cromatograma (recuadro en la parte izquierda inferior de la **Figura 13**), se refiere al intervalo de tiempo que comprende a todas las fracciones polipeptídicas que fueron extraídas y analizadas en nuestros experimentos.

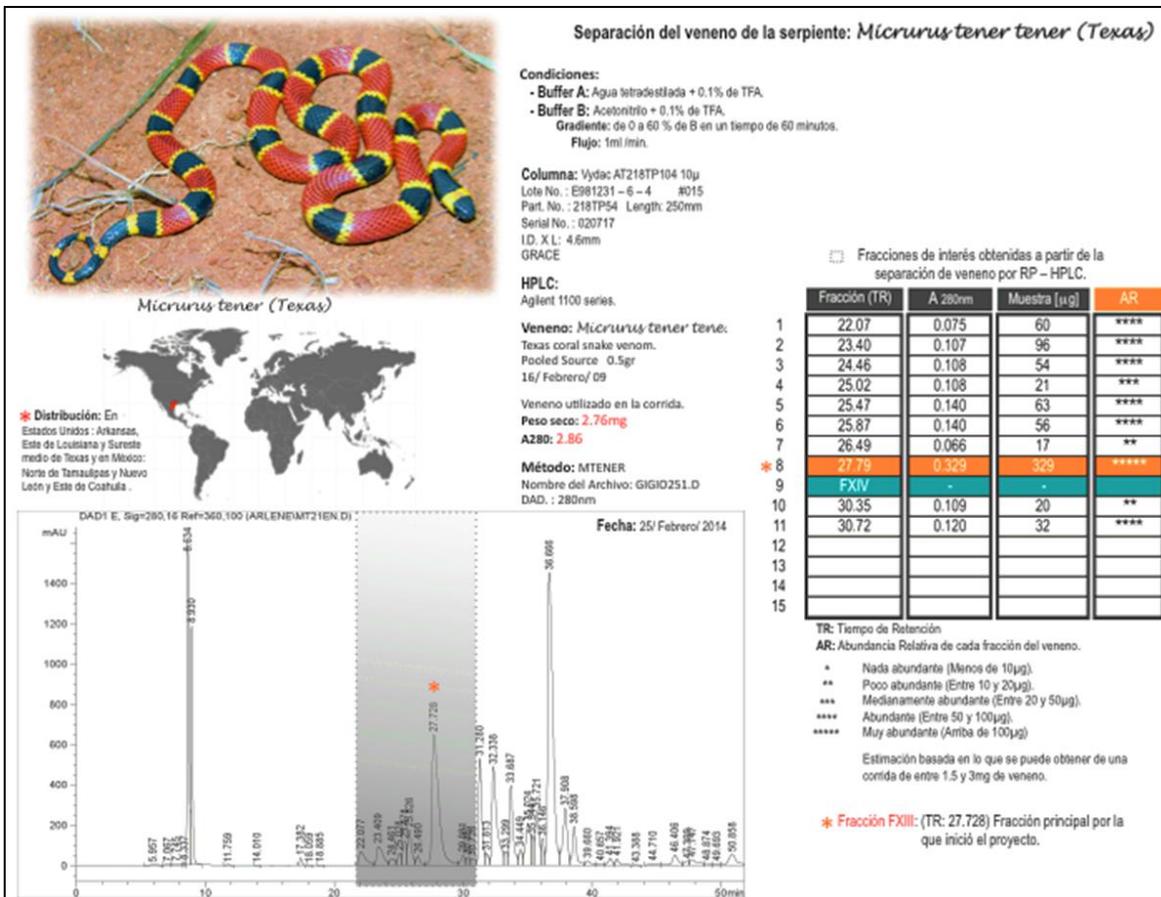


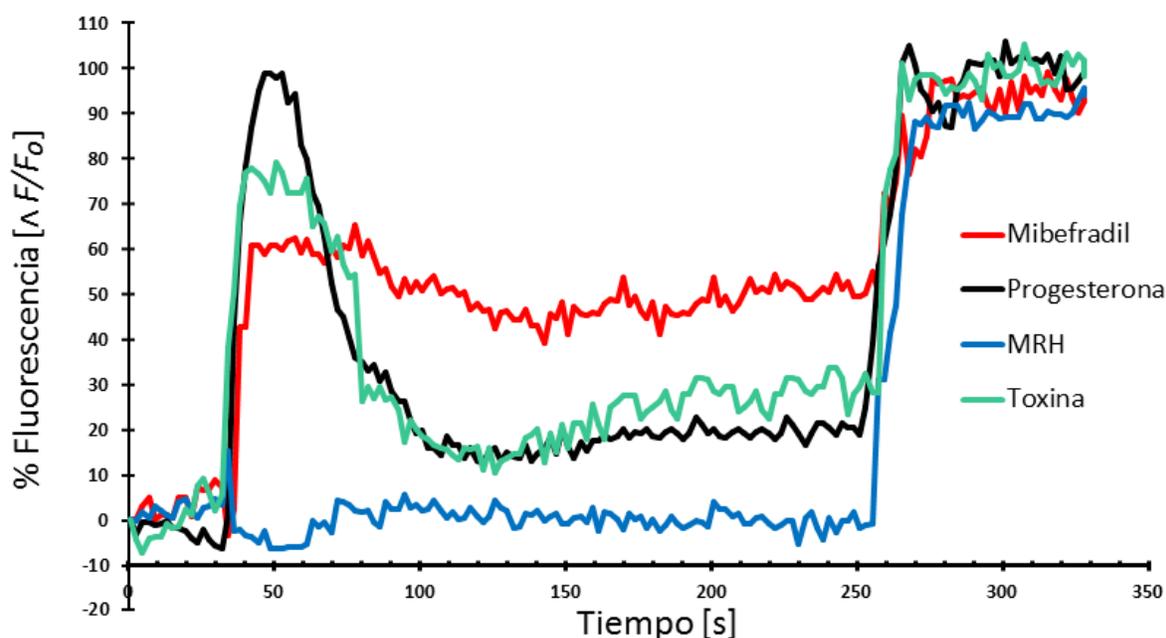
Figura 13. Ficha con el cromatograma de la especie *Micrurus tener*. Incluye especificaciones para la obtención de la separación del veneno en fracciones polipeptídicas (Cardozo H., 2015-no publicado).

2. Respuesta de progesterona en presencia de las fracciones polipeptídicas y respuesta del Ca²⁺.

Del conjunto de los ensayos se obtuvo una gráfica representativa de la cinética del experimento (**Grafica 1**), donde se muestran, en el tiempo (eje horizontal), los cambios de [Ca²⁺]_i expresados en el cambio de fluorescencia relativa (eje vertical, normalizada por el valor de la fluorescencia basal, F₀, y expresada en porcentaje del valor máximo alcanzado al agregar finalmente Ionomicina) por la adición de compuestos a los 30 segundos de iniciado el trazo. En todos los experimentos cada pozo contenía ~3 x 10⁶ células por pozo.

La condición control basal de células, el MRH, es aquella a la cual no se le agrega progesterona (Pg) ni algún otro compuesto, y aparece en color azul. En negro, células en las mismas condiciones, pero a las cuales sí se les agregó Pg a las 30

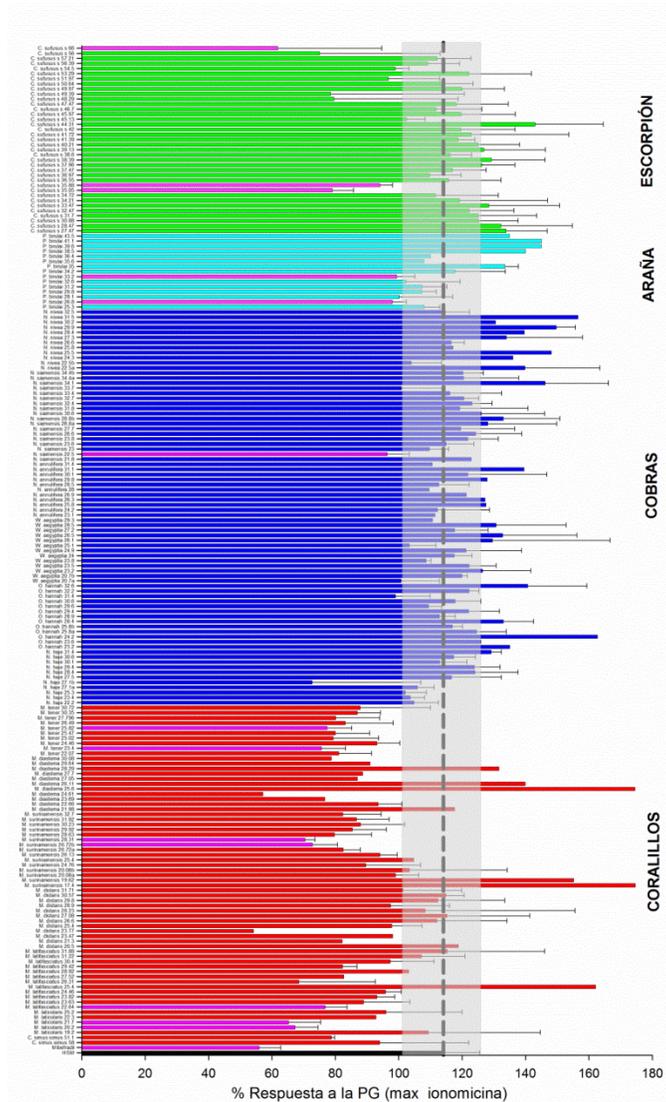
segundos, lo cual constituye un control negativo, ya que no hay ninguna inhibición. Como control positivo, las células pre-incubadas con Mibefradil, un conocido inhibidor de canales de calcio y a los 30 segundos se les agregó Pg. En verde se muestra el trazo para la respuesta de células incubadas previamente con una toxina polipeptídica de coralillo, cuya respuesta a la Pg presenta una inhibición (30s). En todos los casos los espermatozoides responden a la Ionomicina, lo cual indica que la vitalidad de las células al ser capaces de responder ante este ionóforo que permite el paso de iones Ca^{2+} a través de la membrana, incrementando así $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide.



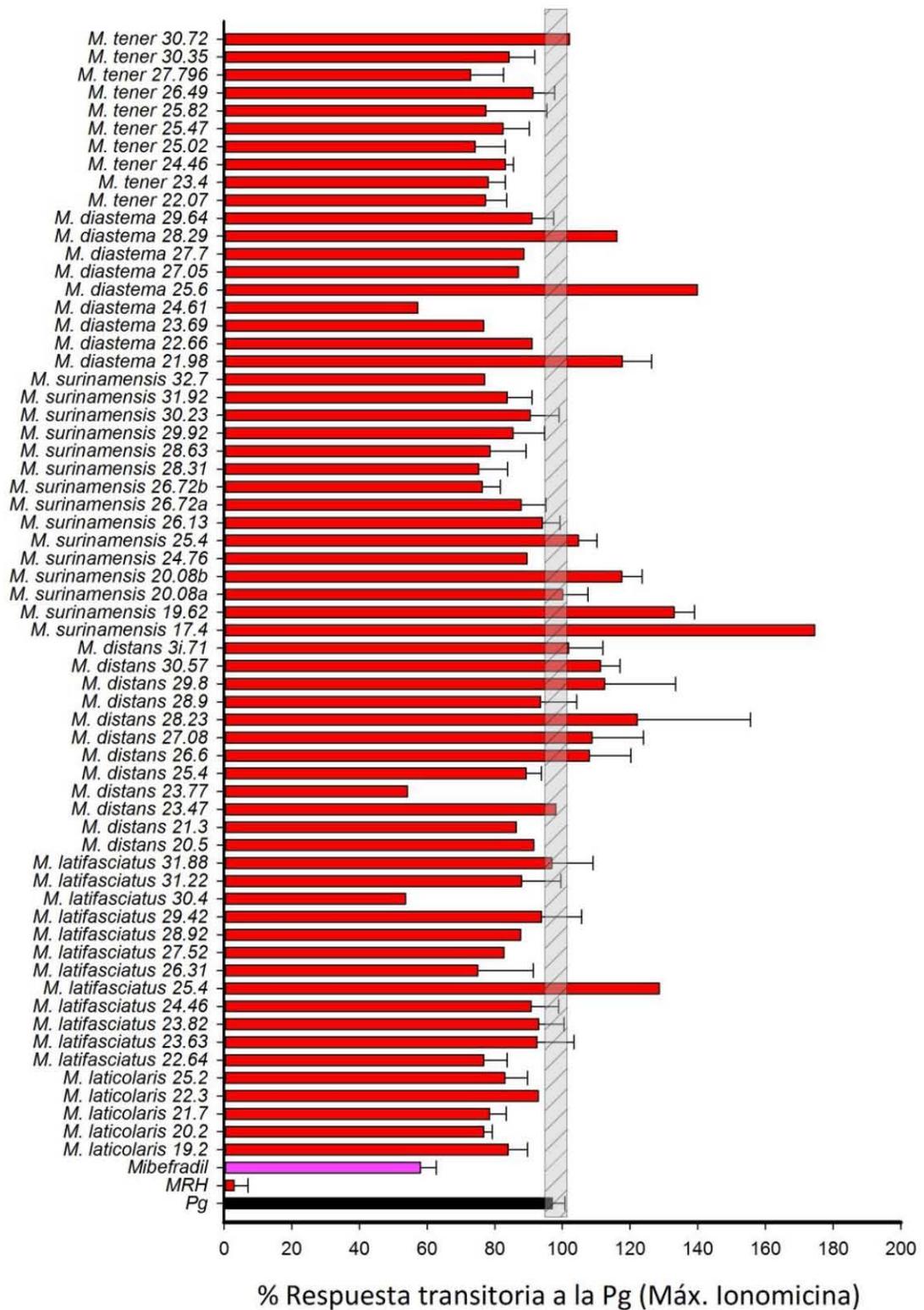
Gráfica 1. Cinética ilustrativa de un experimento típico, a los 30s se agregaron los compuestos: Negro = Control negativo, Pg 4 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$. Rojo = Control positivo, Mibefradil 44.4 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$. Azul = Control basal, medio de registro humano (MRH) pH7.4. Verde = Toxina 6.7×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Y a los 270 s se agrega Ionomicina 10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ en cada condición.

Del total de 950 fracciones polipeptídicas aisladas, 317 de ellas fueron evaluadas en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa) por la Dra. Arlet Loza Huerta, la Pasante de Biol. Elizabeth Cervantes y la autora de esta tesis. La **Gráfica 2** muestra un ejemplo del avance de la evaluación de las fracciones ya probadas. En dicha gráfica, se puede observar que las fracciones provenientes de venenos de serpientes coralillos presentan un mayor número de casos en los que las toxinas que los constituyen, disminuyen la respuesta a la progesterona. Estos resultados se muestran por separado y en detalle en la **Gráfica 3**.

Las **Gráficas 2 y 3** muestran en el eje de las abscisas, el promedio (n=3) de los efectos producidos sobre la respuesta a Pg por cada fracción en estudio. El nombre, en código, que identifica a cada una de las fracciones aparece en las ordenadas. En ambas gráficas el 100 % corresponde a la respuesta máxima a la Ionomicina.



Gráfica 2. Fracciones polipeptídicas ya probadas en el LaNCa con relación a la respuesta a progesterona. Se observa el porcentaje de respuesta respecto al máximo producido por la Ionomicina. La línea sombreada marca el intervalo para \pm el error estándar del promedio para la adición solo de progesterona, usada como control negativo (sin efecto de fracción polipeptídica).



Gráfica 3. Promedios de (RFU) de las 61 fracciones provenientes de venenos de serpientes coralillo, probadas en el LaNCa, con relación a la respuesta a Pg. Se observa el porcentaje de respuesta respecto al máximo, Ionomicina. La línea sombreada marca a lo largo de la gráfica, el intervalo del error estándar del promedio para la adición de progesterona (en negro).

En la **Grafica 3** se puede observar que 9 fracciones muestran un efecto inhibitorio cuyo valor se encuentra por debajo de la franja indicadora del intervalo del error estándar del promedio de la Pg. También se observa el valor de Mibefradil, usado como control positivo al presentar una inhibición de la respuesta a Pg y el MRH, control 0, sin respuesta.

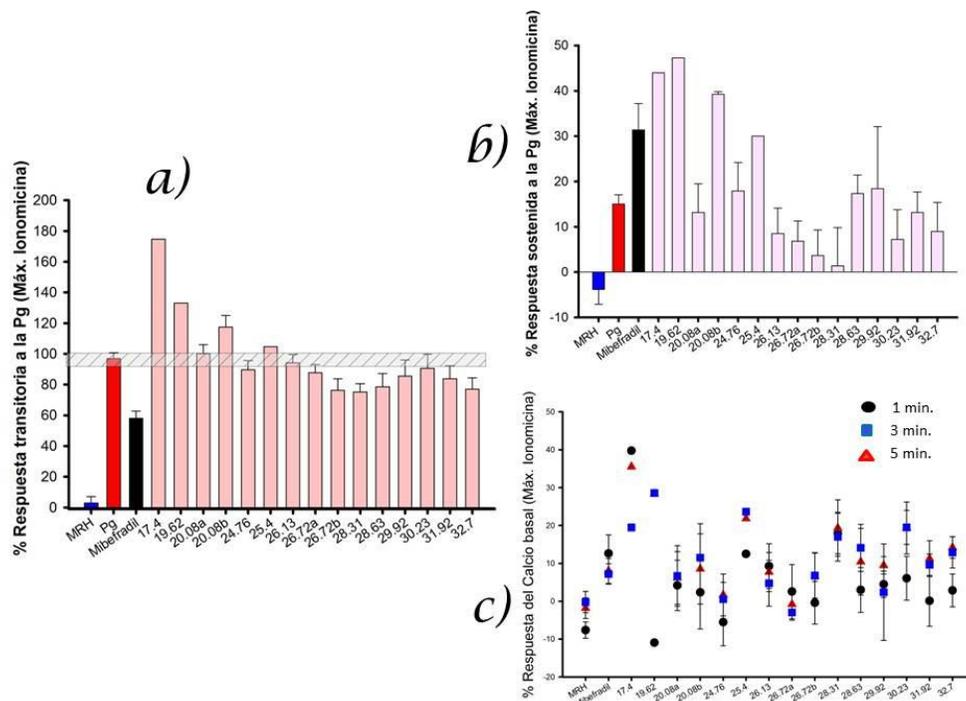
Los datos fueron ordenados como se muestra en la **Tabla 4**, la cual es un ejemplo de la base de datos que se manejó para los resultados de cada especie, así como para cada relación dosis-respuesta. Para cada condición se evaluó la media (promedio), el número de repeticiones totales N (≥ 3), la desviación estándar, el error estándar y el valor de *P* con respecto al control (Pg).

Tabla 4. Extracción de la base de datos empleada para el manejo y análisis de datos resultantes.

	Progesterona 4 μ M/ μ l	<i>Micrurus latifasciatus</i> 22.64					
		0.014 μ g/ μ l	6.7 x 10 ³ μ g/ μ l	6.7 x 10 ⁴ μ g/ μ l	6.7 x 10 ⁵ μ g/ μ l	6.7 x 10 ⁶ μ g/ μ l	6.7 x 10 ⁷ μ g/ μ l
	0.9284753	0.674138	0.7731705	0.7505575	0.7472332	0.8698279	0.9513869
	0.8693618						
	0.9053707		0.8990951				0.8676782
	1.127821		0.7401212				
	0.9284753		0.6644535				
	0.9684224		1.077303	1.128793	0.9204214	1.11304	0.9710466
	0.950586	0.63546	0.8481685				
	0.90491	0.822591	0.8432313	0.8060621	0.8520946	1.084192	
	1.072627	0.8265007	0.8595003				1.420422
	0.869362		0.9169675		1.059754	1.14018	
PROMEDIO	0.96178328	0.73967243	0.8468901	0.895137533	0.8948758	1.051809975	1.052633425
Promedio *100	96.1783278	73.9672425	84.68901	89.51375333	89.48758	105.1809975	105.2633425
N	10	4	9	3	4	4	4
Desviación estanda	0.08455903	0.09928013	0.117801548	0.204245803	0.130978328	0.1234564	0.249254983
Error Estandar	0.02818634	0.04964006	0.039267183	0.117921369	0.065489164	0.0617282	0.124627492
E. e *100	2.81863427	4.96400626	3.926718258	11.79213693	6.548916381	6.172820023	12.46274916
P=		0.002	0.0013	0.4545	0.1219	0.5751	0.5195

Las **Gráficas 4-9** muestran los resultados obtenidos para cada especie de *Micrurus*. En cada gráfica se muestra el porcentaje de respuesta en el transitorio (panel **a**) y el sostenido a la progesterona (panel **b**). En los paneles **c**, se muestra el porcentaje de respuesta del calcio cuando la fracción polipeptídica fue agregada sin adicionar Pg posteriormente, es decir, el calcio basal. Para este último caso, la cinética se evaluó en tres tiempos (1, 3 y 5 minutos) para cada condición, todos ellos normalizados con Ionomicina.

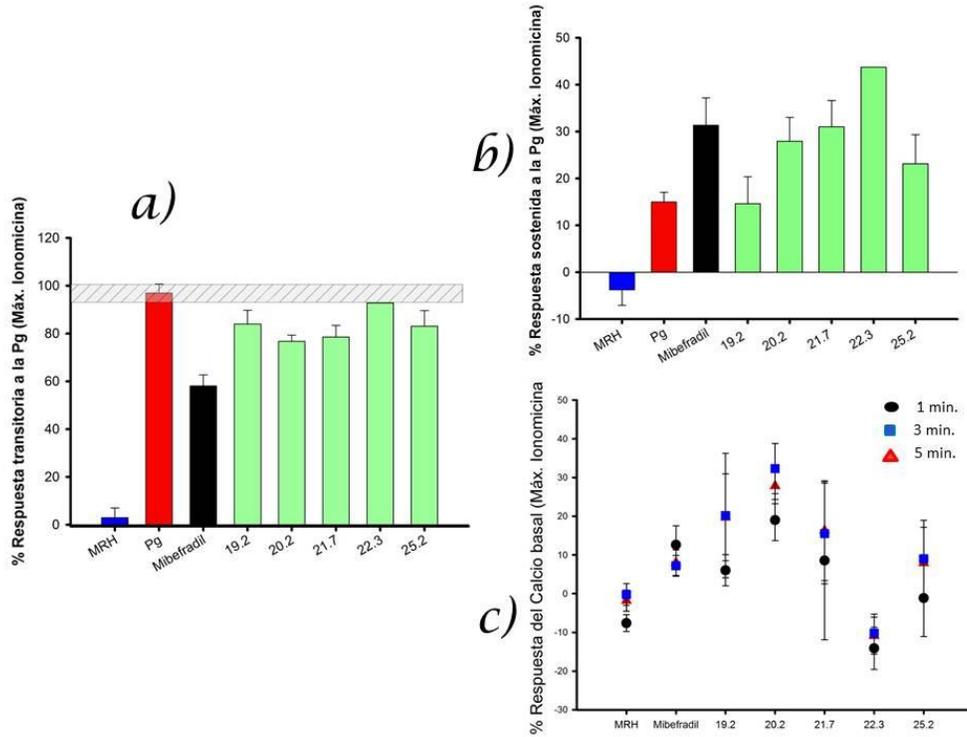
Para los tres paneles o incisos se observan los promedios de los tres controles, respectivamente para cada evaluación. Para los incisos **a** y **b**, el MRH se encuentra en color azul, seguido del valor de Pg en color rojo y el Mibefradil en color negro. Después de estos están los valores del porcentaje del promedio en respuesta de cada fracción polipeptídica correspondiente a cada especie.



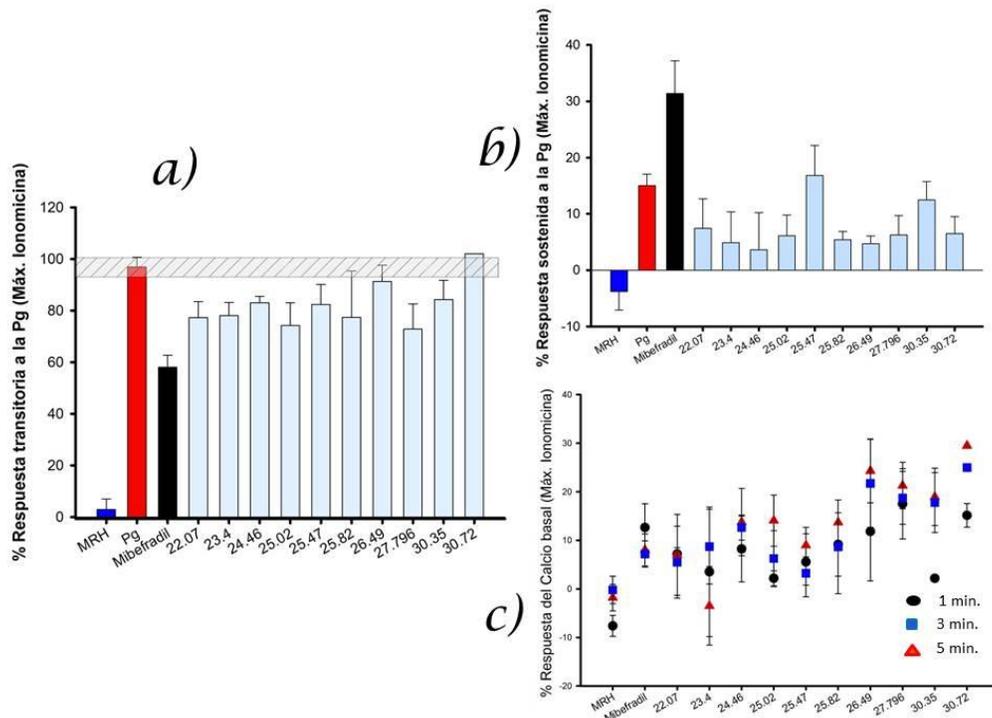
Gráfica 4. *Micrurus surinamensis*. n=3. **a)** Porcentaje de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** Porcentaje de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** Porcentaje de la respuesta del calcio basal en presencia de la fracción polipeptídica.

Para la evaluación de la especie *Micrurus surinamensis* (**Gráfica 4**) se probaron 15 fracciones. En la respuesta transitoria (**a**), para las fracciones 17.4 y 19.62 solo se pudo hacer un experimento por lo que se dejaron de considerar; el resto no mostró una inhibición notoria. Solo tres fracciones (26.72b, 28.31 y 28.63) inhibieron por debajo del error estándar de la Pg. Respecto a la fase sostenida (**b**), fueron estas 3 mismas las que no modificaron el $[Ca^{2+}]_i$. En el inciso **c** (sin la adición de Pg), no hay mayor variación en los 3 tiempos de respuesta. Por estas observaciones, las fracciones 26.72b, 28.31 y 28.63 de esta especie, se valoraron en una segunda etapa de evaluación, caracterizando la dependencia con su concentración.

En la **Gráfica 5** se muestran las 5 fracciones polipeptídicas de *Micrurus laticollaris*, de las cuales, en la respuesta transitoria (**a**) la 22.3 solo se pudo evaluar una vez, la 20.2 y 21.7 fueron las que mostraron mayor inhibición en comparación con las 19.2 y 25.2. Respecto a la fase sostenida (**b**), se puede observar que elevaron el $[Ca^{2+}]_i$ tanto como el Mibefradil. Algo similar ocurre cuando estas se probaron en respuesta al calcio basal (**c**), pero con mayor error, es decir, que varía la $[Ca^{2+}]_i$ del espermatozoide en presencia de las toxinas de esta especie. Para *M. laticollaris*, las fracciones 20.2 y 21.7 se evaluaron en la segunda etapa por presentar cerca de un 20% de inhibición en la respuesta transitoria a la Pg.

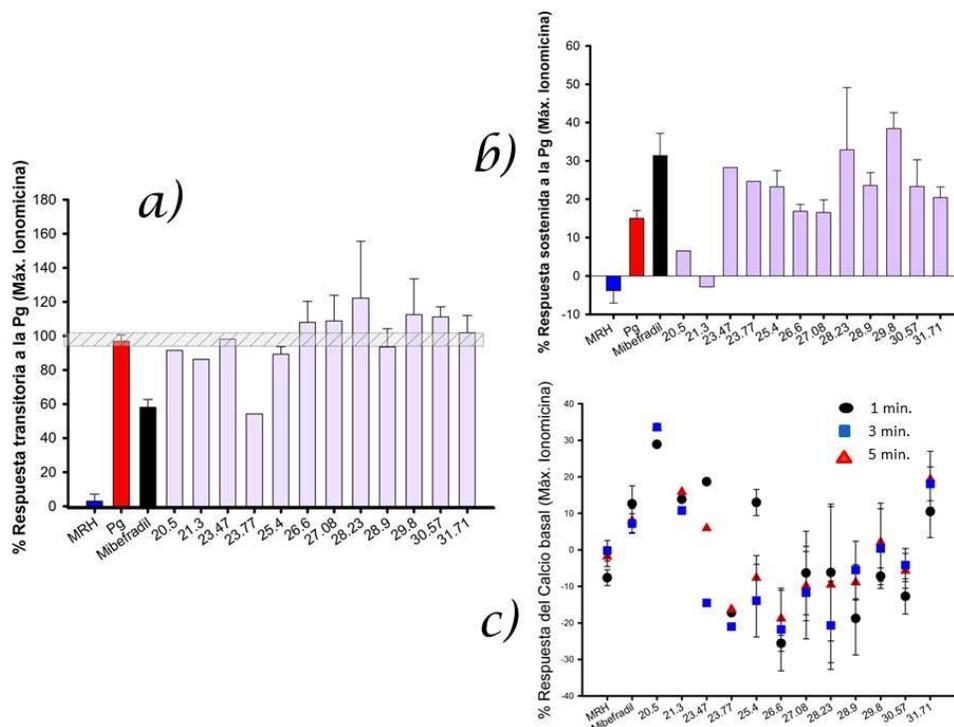


Gráfica 5. *Micrurus laticollaris*. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.



Gráfica 6. *Micrurus tener*. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

En el resultado para *Micrurus tener* (**Gráfica 6**) se probaron 10 fracciones polipeptídicas. Para la respuesta transitoria (**a**) presentaron un grado de inhibición, excepto la 30.72 donde no se pudo repetir el experimento y la 26.49 que está dentro del error estándar de la Pg. Respecto al inciso **b**, a excepción de la fracción 25.47, el resto no sube el $[Ca^{2+}]_i$ en comparación con el MRH. Cuando estas se probaron en la respuesta al calcio basal (**c**) las fracciones 23.4, 24.47 y 25.82 fueron de las que menos modificaron el calcio (sin la adición de Pg). Estas últimas tres toxinas fueron las seleccionadas para evaluar si existía una relación dosis-respuesta.



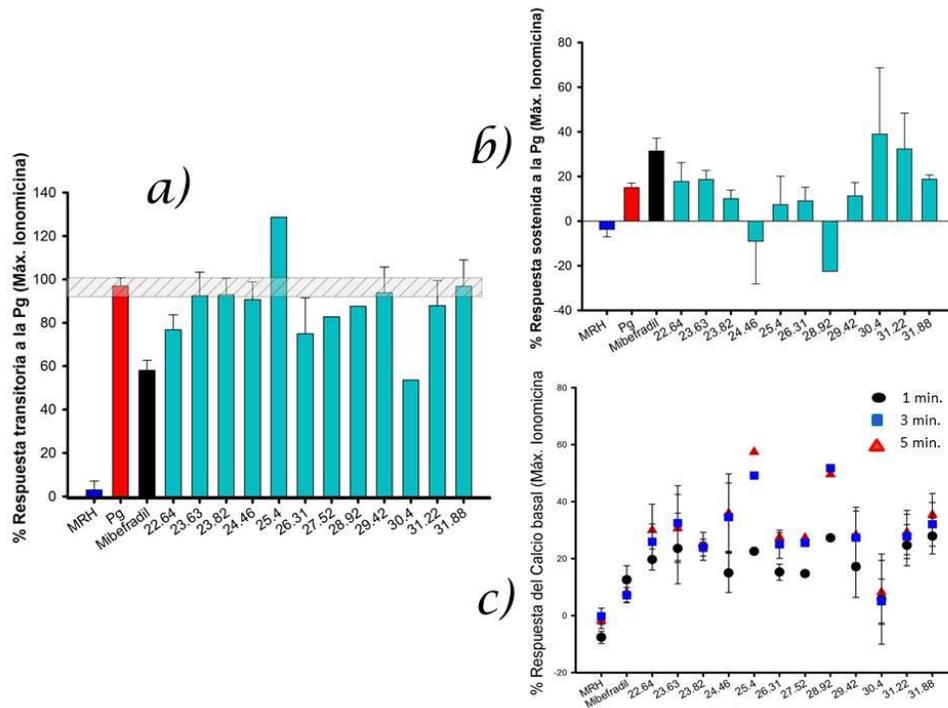
Gráfica 7. *Micrurus distans*. n=1 o 3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

Para a especie *Micrurus distans* (**Gráfica 7**) se probaron 12 fracciones distintas, 4 de ellas no contaban con una n representativa y el resto sobrepaso el valor del control de Pg en la respuesta transitoria (**a**). También se muestra el porcentaje de respuesta en la fase sostenida (**b**) donde los valores de las fracciones también sobrepasan el control, que en este caso es el MRH. Y de la respuesta al calcio basal (**c**), los valores son bastante más bajos que los controles. Razones por las cuales esta especie de dejó de ser estudiada.

La **Gráfica 8** corresponde a la especie *Micrurus latifasciatus*, de la cual se probaron 12 diferentes fracciones polipeptídicas. En la respuesta transitoria (**a**), en tres fracciones solo se pudo hacer un experimento, el resto no mostro una

inhibición en comparación con el control de Pg, a excepción de la fracción 22.64. En la fase sostenida (**b**), se puede observar gran variación con respecto al $[Ca^{2+}]_i$, y en el inciso **c**, todas las fracciones aumentaron en cierto grado a comparación del control MRH.

Se probó la dependencia con la concentración de la fracción *M. latifasciatus* 22.64. Esta mostró cerca de un 20% de inhibición en la respuesta transitoria a la Pg y no elevó significativamente el $[Ca^{2+}]_i$ en la fase sostenida **b**, ni en la respuesta al calcio basal **c**.

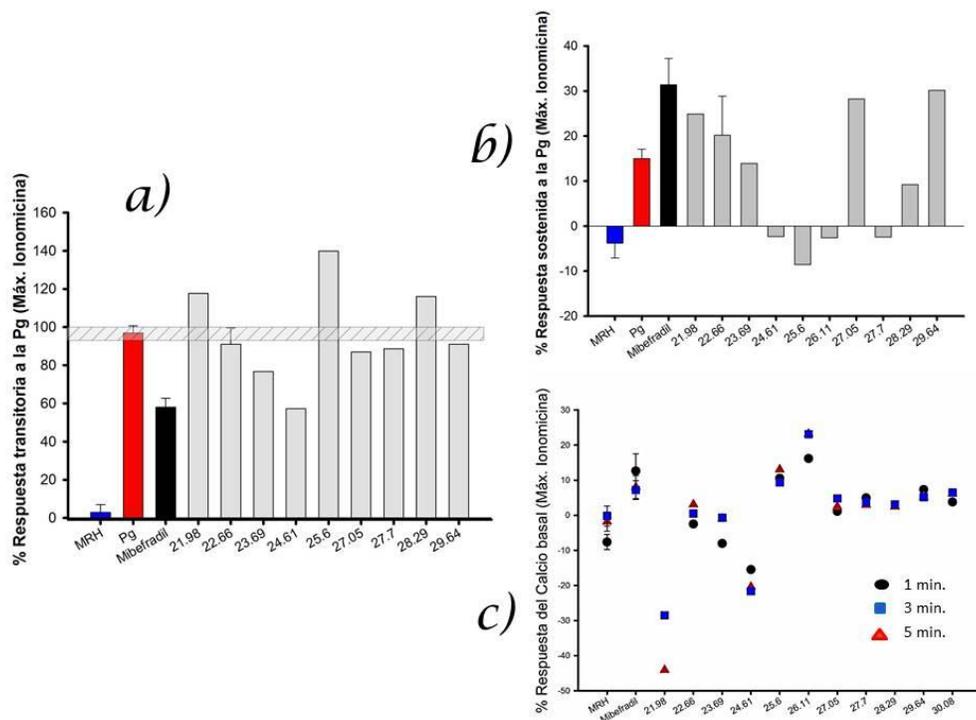


Gráfica 8. *Micrurus latifasciatus*. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

Para *Micrurus diastema* (**Gráfica 9**), en la mayoría de los casos no se contó con suficiente material para una n representativa, por lo que ninguna fracción de esta especie se pudo seguir evaluando. Además que en la única evaluación mostro valores muy altos que no son del interés de esta tesis. Sin embargo, se muestra el porcentaje de respuesta en la fase sostenida (**b**) donde los valores de las fracciones también sobrepasan el control, y de la respuesta al calcio basal (**c**), donde por el contrario, los valores son variables.

En resumen, en los incisos **a** de cada figura, se puede apreciar a simple vista las fracciones polipeptídicas cuyo promedio de porcentaje se encuentra por debajo del error estándar de la Pg en cada especie, es decir, donde hubo una inhibición de la respuesta a Pg a causa de la fracción polipeptídica. En la **Tabla 5** se muestran los

nombres de las 4 especies a las que corresponden las fracciones polipeptídicas con un grado de inhibición mayor con respecto al resto, asociado a sus tiempos de retención y las cuales fueron seleccionadas para la siguiente etapa de evaluación.

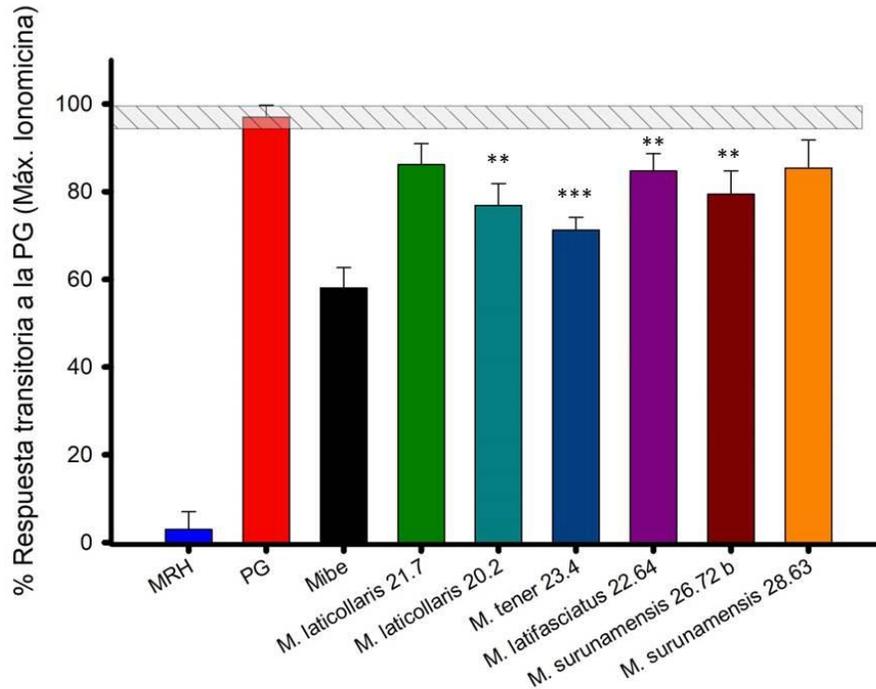


Gráfica 9. *Micrurus diastema*. n=1. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

Tabla 5. Fracciones polipeptídicas que presentaron una inhibición de influjo de Ca^{2+} en presencia de progesterona (nueve en total).

Especie	Tiempo de retención (min)
<i>M. surinamensis</i>	28.63, 28.31, 26.72b
<i>M. latifasciatus</i>	22.64
<i>M. tener</i>	25.82, 24.46, 23.40
<i>M. laticollaris</i>	21.7, 20.2

Posteriormente, de las nueve fracciones seleccionadas, seis se muestran en la **Gráfica 10** para su mejor visualización, ya que son estas las que se analizaron con mayor detalle al contar con suficiente cantidad de fracción polipeptídica para evaluar. De los otros tres posibles potentes inhibidores no se contó con suficiente material para continuar con su estudio.

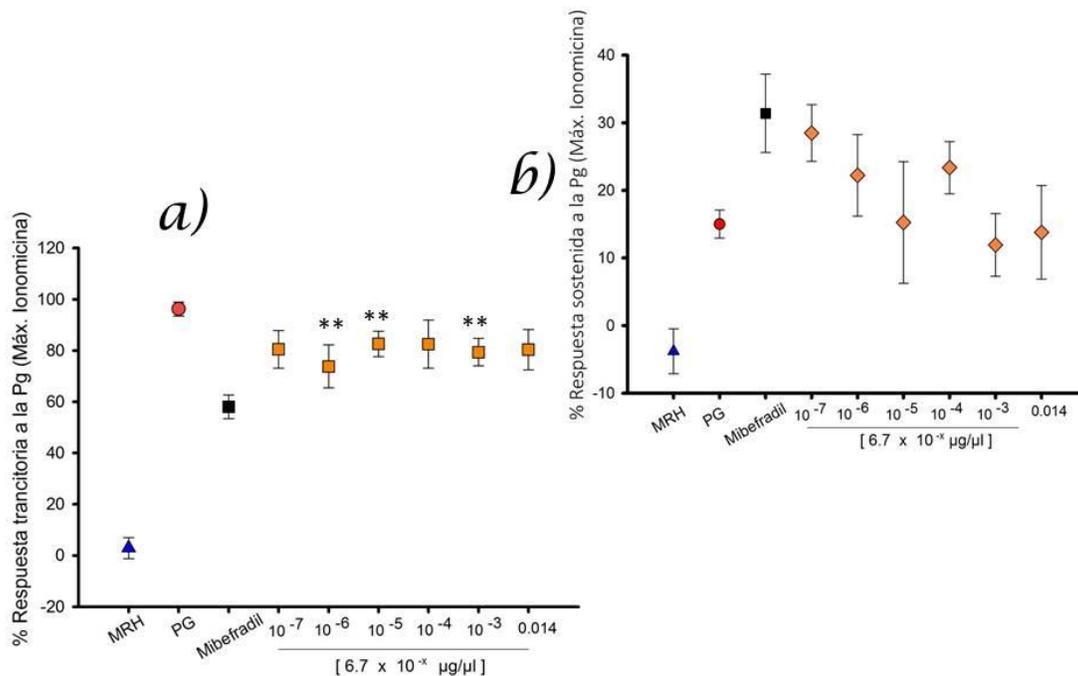


Gráfica 10. Promedios de porcentaje de fluorescencia de 6 fracciones polipeptídicas probadas sobre la respuesta a progesterona (transitorio). Se muestra el porcentaje de respuesta respecto al máximo en la respuesta a la Ionomicina. Se observa inhibición: los valores del promedio y su dispersión (error estándar) se encuentran por debajo del valor mínimo del promedio y el error estándar de la respuesta a la progesterona.

Las 6 fracciones identificadas, se sometieron a un estudio de dosis-respuesta, es decir, se evaluaron en las mismas condiciones, pero a concentraciones de $0.014 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6.7 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6.7 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6.7 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $6.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Como resultante, se obtuvieron las **Gráficas 11-16**, en las cuales se muestra, de igual manera que en las gráficas anteriores, los promedios de los tres controles respectivamente para cada evaluación. Para las gráficas **a** y **b**, el MRH se encuentra en color azul, seguido del valor de Pg en color rojo y el Mibefradil en color negro. Después de estos, están los valores del promedio de porcentaje de respuesta de cada dilución de la fracción polipeptídica respectiva de cada figura y con una n igual a 3.

Debe recordarse que el análisis del calcio basal correspondiente se realizó para corroborar que la fracción polipeptídica no modificara por si sola de manera significativa dicho calcio (incisos **c**).

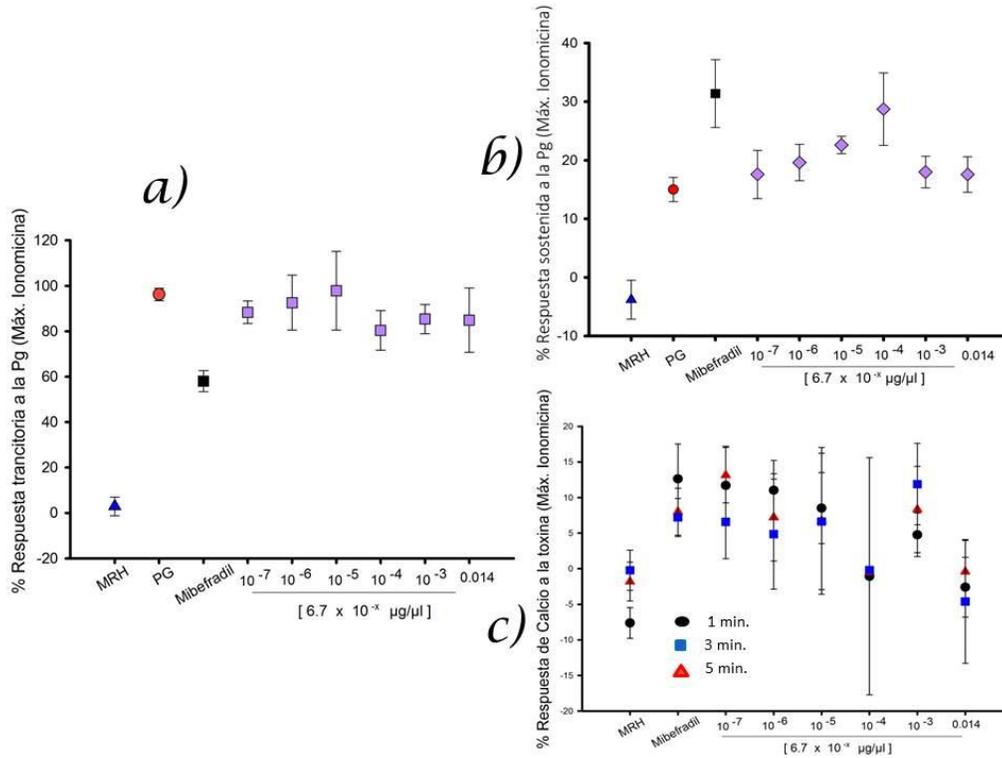


Gráfica 11. *Micrurus surinamensis* 26.72 b. Dosis Respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg.

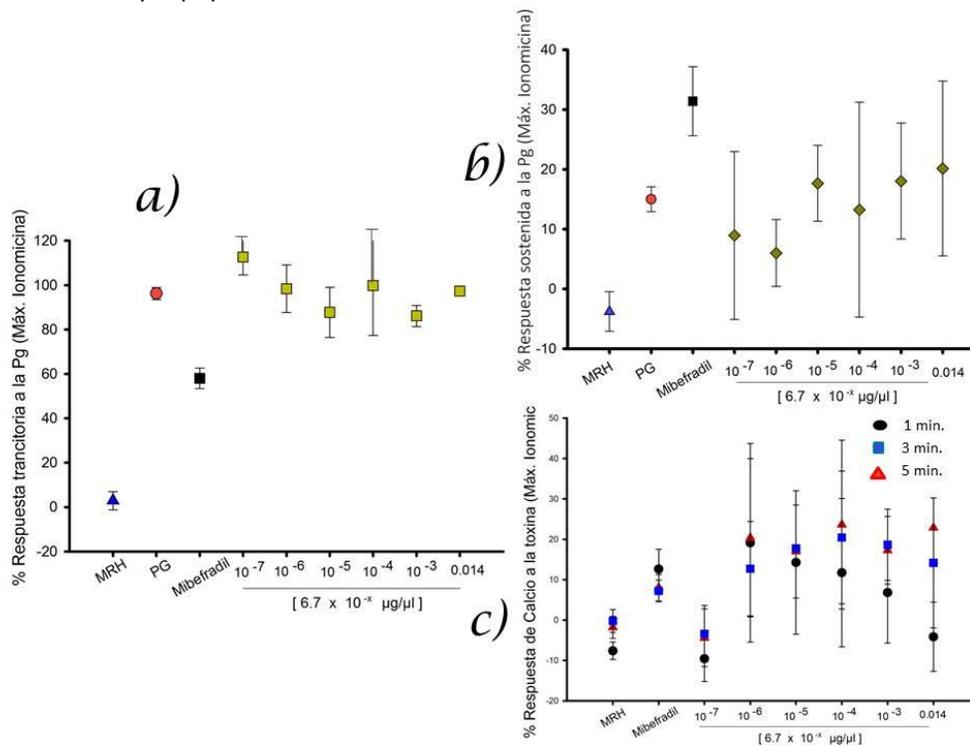
Para la fracción polipeptídica *Micrurus surinamensis* 26.72 b (**Gráfica 11**), en el panel **a** se muestran los tres controles seguidos de la fracción a distintas concentraciones, ordenadas de menor a mayor concentración. En esta gráfica debería poder observarse una dependencia con la concentración, sin embargo, para este caso no ocurre, ya que la prueba de Mann-Whitney marcó una diferencia significativa pero a diferentes concentraciones.

En relación a la respuesta sostenida (**b**), sí es posible observar un comportamiento cercano a una relación dosis-respuesta, lo que se traduce en que el efecto de la toxina se manifiesta sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la fase transitoria. La respuesta al calcio basal (**c**) no se realizó para esta fracción por no contar con el suficiente volumen requerido. Debido a lo anterior, se decidió no proseguir el análisis experimental de la fracción *M. surinamensis* 26.72 b en este trabajo de tesis.

Para *Micrurus surinamensis* 28.63, mostrada en la **Gráfica 12**, en la respuesta transitoria (**a**), las distintas concentraciones de la fracción no muestran un valor significativo de inhibición (los valores de *P* para todas las concentraciones fueron mayores a 0.05) al aumentar la dosis. Lo mismo sucede en **b** y **c**. Por lo cual estos resultados tampoco siguieron siendo de interés para el proyecto general de tesis.

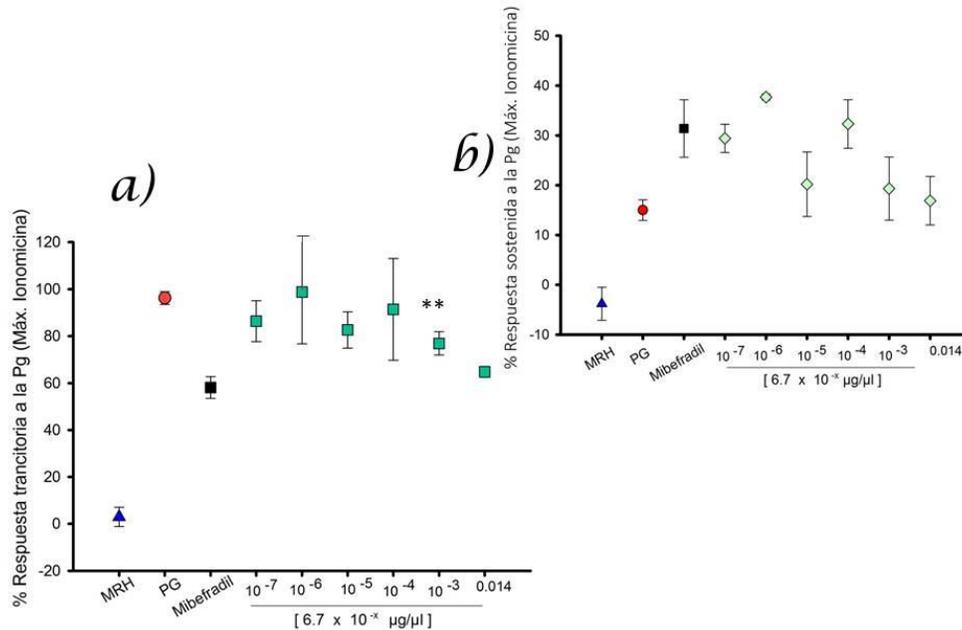


Gráfica 12. *Micrurus surinamensis* 28.63. Dosis respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.



Gráfica 13. *Micrurus laticollaris* 21.7. Dosis respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

La **Gráfica 13** corresponde a la fracción polipeptídica *Micrurus laticollaris* 21.7. En el panel **a**, sí es posible observar un comportamiento cercano a una relación dependiente de la concentración para la fase transitoria. Por otro lado, en el caso de la respuesta sostenida (**b**), a una mayor concentración de la fracción, aumenta $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, los valores para ambos casos no son significativos, $P > 0.05$. De la misma manera en **c**, no existe una significancia entre las variaciones, pues claramente los errores estándar se superponen.



Gráfica 14. *Micrurus laticollaris* 20.2. Dosis respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg.

Los resultados obtenidos con la fracción polipeptídica *Micrurus laticollaris* 20.2, incluida en la **Gráfica 14**, muestran una semicurva en la dosis dependencia (inciso **a**). En las pruebas de mayor concentración hay una diferencia significativa en relación con la Pg ($6.7 \times 10^{-3} \mu\text{M}/\mu\text{l}$ con $P = 0.0073$). Sin embargo, los errores estándar de dos de las concentraciones son muy grandes (21.709 y 22.046) y en la respuesta sostenida existe una gran variación. Además, en este caso, la fracción no fue suficiente para hacer los experimentos para su relación con el calcio basal.

De las cuatro gráficas anteriores, correspondientes a las fracciones polipeptídicas *M. surinamensis* 26.72 b y 28.63, y *M. laticollaris* 20.2 y 21.7, ninguna mostró una evidente dependencia con la concentración de la inhibición de la respuesta a Pg. No obstante, las siguientes dos fracciones mostraron un efecto inhibitorio al aumentar la concentración. Estas fracciones corresponden a las especies *M. latifasciatus* 22.64 (**Gráfica 15**) y *M. tener* 23.4 (**Gráfica 16**).

Después de realizar el análisis de Kruskal-Wallis para *M. latifasciatus* 22.64 se encontró una $P = 0.0107$ y para *M. tener* 23.4 la $P=0.0020$. Estos valores de P menores a 0.05 indican para ambos casos la existencia de una diferencia entre los promedios, es decir, entre el control (Pg) y las diferentes concentraciones de fracción polipeptídica.

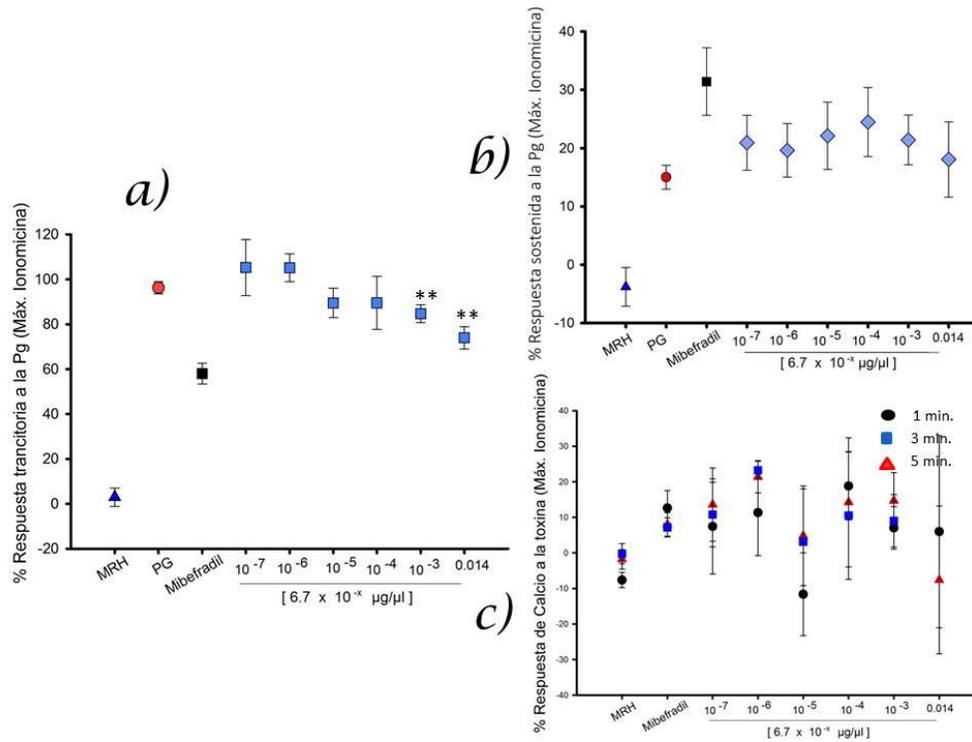
Por intereses del LaNCa, a estas dos últimas fracciones polipeptídicas se les ha modificado el nombre, por lo que *Micrurus tener* 23.4 se le llamará LaNCa 1 y a *Micrurus latifasciatus* 22.64, LaNCa 2.

Mencionado lo anterior, de los resultados se puede resumir que para LaNCa 1, a su más alta concentración ($6.7 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) inhibe significativamente la respuesta transitoria de la progesterona ($P = 0.0001$) y a concentraciones de $6.7 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, lo hace con una significancia menor ($P = 0.0303$ para ambas), por lo cual se acepta que la inhibición muestra una dependencia con la concentración de esta fracción polipeptídica.

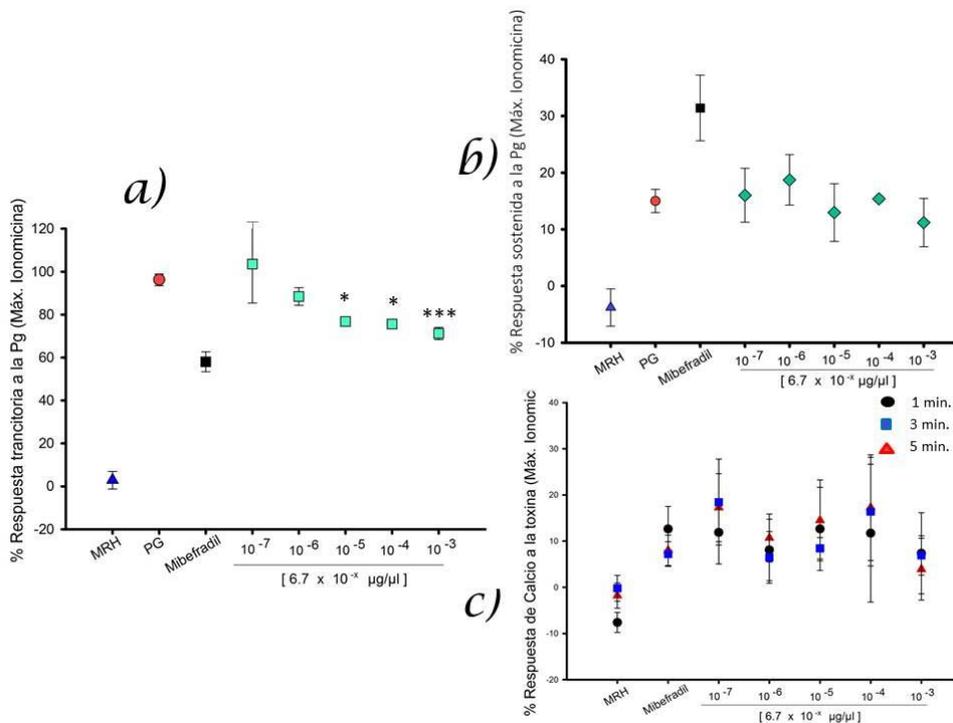
Para LaNCa 2, a $0.014 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $6.7 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, hay una módica diferencia significativa ($P = 0.002$ y 0.0013 correspondientemente) de la concentración con respecto al valor de la progesterona en la respuesta transitoria. A más bajas concentraciones LaNCa 2 ya no presenta un efecto apreciable gráficamente, siendo tampoco significativo estadísticamente.

Para los valores del porcentaje en respuesta al sostenido de Pg y para el porcentaje del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en respuesta a sólo la fracción polipeptídica, en ambas LaNCa, a pesar que en algunos casos fluctuaron, no se encontró una diferencia significativa entre el control (de Pg para los ensayos del sostenido ni con el MRH para el caso calcio basal) y cualquier concentración de LaNCa.

Estos resultados indican la existencia de una gran diversidad de variaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, de las fracciones polipeptídicas provenientes de los venenos de serpientes *Micrurus*, probablemente reflejando la adaptación de las serpientes de este género a hábitats muy diferentes (Tanaka et al., 2010).



Gráfica 15. *Micrurus latifasciatus* 22.64. Dosis respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.



Gráfica 16. *Micrurus tener* 23.4. Dosis respuesta. n=3. **a)** % de la respuesta transitoria a la Pg. **b)** % de la respuesta sostenida a la Pg. **c)** % de la respuesta del calcio basal a la fracción polipeptídica.

Discusión

En este trabajo se buscó un compuesto utilizable como la base química para el desarrollo de un posible anticonceptivo masculino, enfocado en la inhibición del funcionamiento del canal iónico CatSper, mediante fracciones polipeptídicas provenientes de venenos. El contexto en el que se planteó el proyecto se basó en que CatSper es un canal de calcio exclusivo del espermatozoide y fundamental en el proceso fisiológico de la fecundación. La primera subunidad de CatSper, CatSper 1, se describió en 2001 por Ren y colaboradores. Posteriormente este grupo reportó que mutaciones o alteraciones dirigidas del gen que codifica la proteína conducen a defectos en la fisiología del espermatozoide y por lo tanto, a la infertilidad masculina (Ren y Xia, 2010).

En segundo lugar, se partió de que una enorme variedad de toxinas polipeptídicas provenientes de venenos animales, tienen una extraordinaria potencia y especificidad farmacológicas sobre canales iónicos (Salceda y Ortega, 2009). Para encontrar alguna que fuera específica para CatSper se probaron decenas de fracciones aisladas de venenos y tamizadas en este trabajo.

Un análisis cromatográfico en el laboratorio del Dr. Gerardo Corzo del Instituto de Biotecnología de la UNAM, determinó la masa molecular de las fracciones aquí denominadas LaNCa 1 y LaNCa 2. Sus valores correspondieron a 6,575.2 Da y 6,814.2 Da, respectivamente (resultados no publicados). De estos dos valores es posible identificar a las dos fracciones como péptidos o toxinas de Tres Dedos (3FTx, "Three-finger Toxins"), lo cual constituye un resultado central de esta tesis. Este grupo de toxinas incluye algunas muy poderosas y específicas para canales iónicos.

Las toxinas Elápidas de Tres Dedos tienen una configuración molecular plegable, con cuatro uniones covalentes ("puentes") disulfuro (representada con la estructura R-S-S-R') en un núcleo globular y central, de los cuales emergen tres bucles ricos en láminas β . Se distinguen dos clases de neurotoxinas: las "Toxinas de Cadena Corta" de 60/62 residuos, con cuatro enlaces disulfuro y las "Toxinas de Cadena Larga" de 70/74 residuos, con cinco enlaces disulfuro (Endo y Tamiya, 1991). En elápidos, esta estructura de cadena corta se ha incorporado para producir toxinas que interactúan con el AchR, la acetilcolinesterasa y canales tipo L de Ca^{2+} (Alape-Girón et. al., 1999).

En un estudio por RP-HPLC (Bénard-Valle et al., 2014), se identificaron cinco grupos principales de componentes en el veneno de *M. tener*, incluyendo nucleótidos, enzimas PLA2, 3FTx y péptidos de bajo peso molecular. De estos, las PLA2 (45,6%) y 3FTx (37,5%) son los grupos de toxinas más relevantes que actúan durante un envenenamiento. El grupo 3FTx está compuesto de 9

fracciones que van entre 25 y 34 minutos de retención. De los resultados de esta tesis se puede agregar que desde el tiempo 23.4 min, corresponde al grupo 3FTx.

Además, el estudio de aquellos autores concluye que la gran diversidad y abundancia de fracciones sin efecto observable, sugiere que las fracciones letales observadas no son las únicas fracciones tóxicas relevantes dentro del veneno y enfatizaron la posible relevancia de la interacción entre los componentes para generar la parálisis flácida, causada por el veneno crudo. De lo anterior, se podría argumentar que no necesariamente cada componente del veneno tiene una función perjudicial, por el contrario, al extender estudios de ciencia básica, semejantes a los de esta tesis, se podrían descubrir e identificar aquellas fracciones tóxicas que puedan significar beneficios a la salud del hombre, tal como se ha visto en muchos otros casos que dieron como resultado final algún tipo de fármaco. Un ejemplo de lo anterior es el caso de la serpiente Mocasín de Malasia (*Calloselasma rhodostoma*) ya que su veneno contiene una proteína llamada Ancrón que puede evitar una trombosis al generar un agente anticoagulante.

Otro análisis (Galat, et.al., 2008) realizado para comprender los mecanismos de plegado y la gran diversidad funcional asociada a varias estructuras tridimensionales 3FTx, reveló que estas pueden tener hasta seis enlaces disulfuro. De estos, tres imponen restricciones geométricas específicas y los otros tres (las cistinas B1, B2 y B4) tienen la misma topología altamente conservada e imponen una importante contribución estabilizadora, esencial para el plegado de las 3FTx como en ectodominios de varios receptores celulares. Junto con algunos aminoácidos adyacentes, estos dominios están implicados en un gran número de contactos atómicos y proporcionan importantes contribuciones energéticas. Dicho estudio podría darnos pautas para la investigación de la interacción molecular de las LaNCa aquí seleccionadas con el canal CatSper.

En otro punto, al utilizarse metodologías basadas en fluoróforos sensibles a iones en el estudio de la actividad de canales iónicos, los canales permeables a Ca^{2+} son los más favorecidos. Estos son sujeto de estudios realizados con tecnologías de tamizaje de alto rendimiento (“high-throughput screening, HTS”) basadas en fluorescencia y empleadas en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos como candidatos a medicamentos con acción directa sobre canales de Ca^{2+} (Picones et al., 2016).

Cabe mencionar junto con el párrafo anterior, que el número total (317) de las fracciones probadas es elevado debido a la rapidez con la que su acción fue probada, gracias al uso de instrumentación automatizada, en este caso, del multilector de placa FlexStation 3. El ensayo experimental utilizado en este trabajo de tesis fue diseñado a manera de medir la actividad directa del canal CatSper, puesto que el registro se hacía con células vivas aptas para dar una respuesta fisiológica y en tiempo real, es decir, la medición fluorométrica se realizaba al momento mismo de producirse el cambio en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, siguiendo su curso temporal

antes y después de aplicarse el estímulo y demás agregados (Progesterona, fracción polipeptídica y Ionomicina). Todo lo anterior realizado por el instrumento de forma automatizada siguiendo el procedimiento pre-establecido por el experimentador.

Si bien hay información acerca de muchos bloqueadores de CatSper, no hay antecedentes publicados de la evaluación de una amplia variedad fracciones peptídicas o tóxicas sobre la función de este canal del espermatozoide, lo cual resalta la originalidad de los resultados encontrados en el presente estudio. Los resultados obtenidos de la acción inhibidora de LaNca1 y LaNca2 no son absolutamente concluyentes, ya que es apenas el primer paso en la investigación. Sin embargo, estos resultados son valiosos ya que son los primeros en identificar inhibidores de la actividad de CatSper que provienen del tamizaje de un número grande de toxinas de venenos de serpientes coralillos y empleando para ello una metodología basada en instrumentación automatizada.

Por último, considerando la grave pérdida de la biodiversidad que se ha venido manifestando en los últimos años, es importante señalar el valor agregado que pueden tener los organismos aquí estudiados, ya que son fuente de recursos genómicos, biotecnológicos o/y bioquímicos. En muchos trabajos se considera que la conservación de la biodiversidad podría tener un mayor apoyo si se hacen notar las ventajas prácticas y aprovechables que puedan encontrarse en los diversos ecosistemas y/u organismos. No obstante, en la gran mayoría de los casos, desconocemos las posibles aplicaciones de tales recursos, ya sea por falta del desarrollo de inventarios así como de accesos a tales recursos.

Sin embargo, si trabajos como la presente tesis pudiesen ayudar a demostrar el potencial que contienen dichos recursos, en este caso serpientes de coral, se podrá, por un lado incentivar la investigación científica activa en estos campos y por otro, el generar conciencia en la sociedad y un mayor apoyo a la conservación y uso adecuado de los recursos de nuestro país.

Conclusiones

Este trabajo de tesis, desarrollado en el Laboratorio Nacional de Canalopatías, constituyó parte integral de un estudio experimental, el cual es el inicio de una búsqueda a partir de un gran número de toxinas, es decir, un amplio tamizaje primario. El estudio consistió en la separación por RP-HPLC de 950 diferentes fracciones polipeptídicas provenientes de venenos de distintas especies animales, alcanzándose el tamizaje de 317 que han sido ya probadas y analizadas en un

ensayo fisiológico. Esta tesis se centró en 61 de estas fracciones, correspondientes a venenos de serpientes Coralillos.

Se logró la estandarización de las condiciones experimentales para la evaluación de la acción farmacológica de esas fracciones polipeptídicas sobre espermatozoides de humano, enfocándose y resaltando la importancia de evaluar la actividad del canal iónico CatSper directamente, mediante la medición del curso temporal de la fluorescencia emitida por un fluoróforo detector de Ca^{2+} y haciendo uso de equipo automatizado de alto rendimiento.

Se obtuvieron 9 fracciones polipeptídicas que disminuyen el influjo de Ca^{2+} a través del canal CatSper, al ser éste activado por progesterona, mediante un método rápido, eficaz y con base a la respuesta fisiológica del espermatozoide. Dos de aquellas fracciones se destacaron por presentar una dependencia con la concentración.

Las dos toxinas de tres dedos LaNCa 1 y LaNCa 2, poseen la potencialidad de constituirse como la base química para el desarrollo futuro de un posible anticonceptivo masculino, el cual bien pudiese ser el primero en su clase, al evitar que el espermatozoide adquiera su estado de hiperactivación, impidiendo su desplazamiento hacia el encuentro con el óvulo y evitándose así la fecundación.

Perspectivas

Un anticonceptivo debe tener ciertas características para su uso, dentro de las cuales se encuentra que su efecto sea reversible, es decir, que al desechar el fármaco naturalmente del organismo, éste tenga la capacidad de recuperar la capacidad reproductiva original; que no produzca efectos secundarios adversos, sin repercusiones sobre cualquier otro tipo celular; que su efecto sea eficaz y específico en su acción sobre el blanco; y confiable, que se tenga una total seguridad de su Índice de Pearl (WHO, 2009).

Para esto, lo procedente será el estudio de la especificidad farmacológica de LaNCa 1 y 2, mediante la caracterización experimental de su efecto sobre otros canales iónicos, tanto aquellos permeables a Ca^{2+} , como a otros iones. Posteriormente, estas fracciones deberán probarse sobre blancos moleculares diferentes a canales iónicos y en otros tipos celulares, en espera que no causen algún efecto nocivo de importancia.

Además, claro está, seguir en la búsqueda, analizando las restantes fracciones polipeptídicas de la biblioteca con la que cuenta el LaNCa, que muestren una inhibición de CatSper, incluso posible y esperadamente mayor al de las toxinas LaNCa 1 y LaNCa 2.

Literatura citada

1. Alasmari, W., Barratt, C.L.R., Publicover, S.J., Whalley, K.M., Foster E., Kay, V., da Silva, S.M. and S. K. Oxenham. 2013. The clinical significance of calcium signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Human Reproduction*. 28(4): 866–876.
2. Alape-Girón, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Díaz, M., Gutiérrez, J. M., Thelestam, M., Bergman, T., and JoErnvall, H. 1999. Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *European journal of biochemistry*, 259(1-2), 225-234.
3. Apesteuguía, S. 2007. Lepidosaurios en movimiento. *Investigación y Ciencia*, 55.
4. Aird, S. D. 2002. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, 40(4), 335-393.
5. Arita, H. T. 2003. Los animáculos de Leeuwenhoek. *Ciencias* 071, 66-68.
6. Balinsky, B. y Fabian, B.C. 1998. *Introducción a la Embriología*. Ed. Omega. España.
7. Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt C. and Publicover S. 2004. Mobilization of stored calcium in the neck region of human sperm—a mechanism for regulation of flagellar activity. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 615-626.
8. Bénard-Valle, M., Carbajal-Saucedo, A., de Roodt, A., López-Vera, E., and Alagón, A. 2014. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*, 77, 6-15.
9. Bolaños, R., Cerdas, L., and Abalos, J. W. 1978. Venenos de las serpientes coral (*Micrurus* spp.): informe sobre un antiveneno polivalente para las Américas.
10. Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller A. Kaupp UB and Strünker T. 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO journal*, 31(7), 1654-1665.
11. Burkman, R., Schlesselman, J. J. and Ziemann, M. 2004. Safety concerns and health benefits associated with oral contraception. *American journal of obstetrics and gynecology*, 190(4), S5-S22.
12. Bye, A. P. and Gibbins, J. M., 2015. Note, Application. n.d Development of a platelet calcium flux assay using Fura-2, AM on the FlexStation 3 reader. University of Reading. Simon Lydford: Molecular Devices (UK) Ltd.
13. Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., González-González, M. E., Galicia-Chavarría, M., Larrea, F. and Gerton, G. L. 2006. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biology of reproduction*, 74(4), 760-768.

14. Cabero, L., Saldívar, D., y Cabrillo, E. 2007. Obstetricia y medicina materno-fetal. Enfermedades infecciosas y embarazo II. Madrid, España: Editorial Panamericana, 721-24.
15. Campbell, J. A. L. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere (No. 597.96165 C3).
16. Carlson, A. E., Burnett, L. A., del Camino, D., Quill, T. A., Hille, B., Chong, J. A., Moran, M.M. and Babcock, D.F. 2009. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One*, 4(8), e6844.
17. Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B. and Babcock, D. F. 2005. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32238-32244.
18. Chang, H., & Suarez, S. S. 2011. Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biology of reproduction*, 85(2), 296-305.
19. Chung, J. J., Miki, K., Kim, D., Shim, S. H., Shi, H. F., Hwang, J. Y. and Clapham, D. E. 2017. CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *eLife*, 6, e23082.
20. Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., y Flores, F. 2006. El sistema endocrino. Invitación a la Biología, 6ta. Edición en Español. Buenos Aires: Médica Panamericana. 679pp.
21. Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., & Treviño, C. L. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Developmental biology*, 240(1), 1-14.
22. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., and Treviño, C. L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305-1355.
23. del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil, P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista internacional de andrología*, 5(4), 368-373.
24. Dennis, E. A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13057-13057.
25. Endo, T. and Tamiya, N. 1991. Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In *Snake Toxins* (Harvey, A.L., ed.), pp. 165-222, Pergamon Press, New York.
26. Efremov, R. G., Volynsky, P. E., Nolde, D. E., Dubovskii, P. V., and Arseniev, A. S. 2002. Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modeling study. *Biophysical journal*, 83(1), 144-153.

27. FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader. User Guide. 2013. Molecular Devices. 1311 Orleans Drive, Sunnyvale, California, United States of America 94089. Recuperado de: https://chemistry.tcnj.edu/files/2015/09/FlexStation_User_Guide_RevB.pdf
28. FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader. 2016. Molecular Devices. Recuperado de: <https://www.moleculardevices.com/systems/microplate-readers/multi-mode-readers/flexstation-3-multi-mode-microplate-reader>
29. FlexStation 3 reader University of Reading. Simon Lydford: Molecular Devices (UK) Ltd.
30. Flores, E. E., y Aranzábal, M. D. C. U. (Eds.). 2002. Atlas de histología de vertebrados. UNAM.
31. Gilbert. Scott F. 2005. Biología del desarrollo. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana.
32. Glaser, T., Castillo, A. R. G., Oliveira, Á. and Ulrich, H. 2016. Intracellular calcium measurements for functional characterization of neuronal phenotypes. *Embryonic Stem Cell Protocols*, 245-255.
33. GraphPad Software, La Jolla, California EE.UU., www.graphpad.com
34. Gupta, S. K., and Bhandari, B. 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology*, 13(1), 97-105.
35. Gutiérrez de agua R. 2014. Fisiología del espermatozoide humano. En Cerezo P. G., Castilla Alcalá J. y Rodríguez H. H. M. (Eds.). Manual para el análisis básico de semen: Una guía práctica. Editorial Prado. 2014. México 978-607-7566-57-1.
36. Herman, B. Centonze, V . Lakowicz , J. Murphy, D. Spring, K. Michael W. and Davidson. 2015 Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence - Basic Concepts in Fluorescence. Micro.magnet.fsu.edu. Recuperado de: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
37. Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes (Vol. 507). Sunderland, MA: Sinauer.
38. Ho, H. C., Granish, K. A., and Suarez, S. S. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental biology*, 250(1), 208-217.
39. Huleihel, M., AbuElhija, M., and Lunenfeld, E. 2007. In vitro culture of testicular germ cells: regulatory factors and limitations. *Growth Factors*, 25(4), 236-252.
40. iNaturalist. Available from <http://www.inaturalist.org>. Accessed 2017.
41. INEGI. Censo de Población y Vivienda, 2017. CONAPO Encuesta Intercensal 2015. Recuperado de URL: <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/estructura/>
42. INEGI. Censo de Población y Vivienda, 2010b. CONAPO. Proyecciones de la población. Recuperado de: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>

43. IUCN 2017. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 16 jun 2017.
44. Jin, J., Jin, N., Zheng, H., Ro, S., Tafolla, D., Sanders, K. M. and Yan, W. 2007. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of reproduction*, 77(1), 37-44.
45. Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D. E. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439(7077), 737-740.
46. Knapman, A. and Connor, M. 2015. Fluorescence-Based, High-Throughput Assays for μ -Opioid Receptor Activation Using a Membrane Potential-Sensitive Dye. *Opioid Receptors: Methods and Protocols*, 177-185.
47. Kochva, E. 1987. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25(1), 65-106.
48. Kumar, T. K. S., Jayaraman, G., Lee, C. S., Arunkumar, A. I., Sivaraman, T., Samuel, D., and Yu, C. 1997. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 15(3), 431-463.
49. Lishko, P., Clapham, D. E., Navarro, B. and Kirichok, Y. 2013. Sperm patch-clamp. *Methods in enzymology*, 525, 59.
50. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391.
51. Lishko, P.V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.J., Clapham, D.E., 2012. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 453–475.
52. López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A. and Treviño, C. L. 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular human reproduction*, 20(7), 619-629.
53. Martínez M. y Moctezuma, C., Métodos físico-Químicos en Biotecnología Espectrofluorometría. 2006. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 67 pags.
54. Mata-Martínez, E., José, O., Torres-Rodríguez, P., Solís-López, A., Sánchez-Tusie, A. A., Sánchez-Guevara, Y. and Treviño, C. L. 2013. Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (75).
55. Matorras, M., Hernández, J., y Molero, D. 2008. Tratado de reproducción humana para enfermería. Editorial Médica Panamericana; Madrid.
56. Moreno, V., Bosch, F. X., Muñoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., Walboomers, J. M. and International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. Effect of oral contraceptives on

risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*, 359(9312), 1085-1092.

57. Odet, F., Duan, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Kung, A., Eddy, E. M. and Goldberg, E. 2008. Expression of the Gene for Mouse Lactate Dehydrogenase C (Ldhc) Is Required for Male Fertility 1. *Biology of reproduction*, 79(1), 26-34.
58. OMS. 2017. Centro de prensa. Planificación familiar (Nota descriptiva). Julio 2017. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs351/es/>
59. Pérez-Ortega, J.E. y Picones, A. 2016. Programa de computación DrugSearchWare. Registro Público del Derecho de Autor. Número de registro 03-2016-111512124800-01. Secretaria de Cultura. Instituto Nacional del Derecho de Autor. Mexico.
60. Picones, A. y Hernández-Cruz, A. 2014. Con-tro-lan-do la reproducción humana: el papel crítico de los canales iónicos. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 57: 3-6
61. Picones, A., Loza-Huerta, A., Segura.Chama, P. and Lara-Figueroa, C.O. 2016. Contribution of automated technologies to ion channel drug discovery. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 104: 357-378.
62. Possani, L. D., Alagón, A. C., Fletcher, P. L., Varela, M. J., and Juliá, J. Z. 1979. Purification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). *Biochemical Journal*, 179(3), 603-606.
63. Quill, T. A., Ren, D., Clapham, D. E., and Garbers, D. L. 2001. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12527-12531.
64. Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., and Garbers, D. L. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14869-14874.
65. Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L. and Clapham, D.E. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603-609.
66. Ren, D., and Xia, J. 2010. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology*, 25(3), 165-175.
67. Rey Vázquez, G. 2012. Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
68. Roze, J. A. 1996. Coral snakes of the Americas: biology, identification, and venoms. Krieger Publishing Company.

69. Salceda, E., y Ortega, A. 2009. Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos*, 74, 29-37.
70. Savage, J. M., and Slowinski, J. B. 1992. The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 45(3), 235-254.
71. Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D. L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., Frederiksen H., Wäschle B., Kaupp U.B, Balbach M., Wachten D., Skakkebaek N.E., Almstrup K., and Strünker. 2014. Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO reports*, 15(7), 758-765.
72. Schulz, R.W. and Nóbrega, R.H. 2011. Regulation of Spermatogenesis. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment, Vol 1 (Farrell, A.P. ed), Academic Press, San Diego. 627-634.
73. Singh, A. P., and Rajender, S. 2015. CatSper channel, sperm function and male fertility. Reproductive biomedicine online, vol. 30, (1), 28-38.
74. Stival, C., Molina, L. D. C. P., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., and Krapf, D. 2016. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization. 93-106.
75. Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. and Kaupp, U. B. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382-386.
76. Suarez, S. 2008. Control of hyperactivation in sperm. Human reproduction update, 14(6), 647-657.
77. Tanaka, G. D., Maria de Fátima, D. F., Portaro, F. C., Sant'Anna, O. A., & Tambourgi, D. V. 2010. Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e622.
78. Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M. and Baldi, E. 2014. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction*, 29(3), 418-428.
79. Trémeau, O., Lemaire, C., Drevet, P., Pinkasfeld, S., Ducancel, F., Boulain, J. C. and Ménez, A. 1995. Genetic engineering of snake toxins the functional site of Erabutoxin a, as delineated by site-directed mutagenesis, includes variant residues. *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9362-9369.
80. Tsetlin, V. 1999. Snake venom α -neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *The FEBS Journal*, 264(2), 281-286.
81. Uetz, P., Freed, P. and Jirí Hošek (eds.), The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed agost 2017. Last changed or updated: 29 Dec 2016.

82. Veitinger, T., Riffell, J. R., Veitinger, S., Nascimento, J. M., Triller, A., Chandsawangbhuwana, C., Schwane K., Geerts A., Wunder F., Berns M.W., Neuhaus E.M., Zimmer R.K., Spehr M. and Hatt H. 2011. Chemosensory Ca^{2+} dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17311-17325.
83. Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J. L., Acevedo, J. J. and Darszon, A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), 395.
84. World Health Organization. Medical eligibility criteria for contraceptive use.4th ed. Geneva: WHO; 2009.