



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE FRACCIONES POLIPEPTÍDICAS
DE VENENOS DE SERPIENTES (FAMILIA
ELAPIDAE) COMO POSIBLES BLOQUEADORES
DEL CANAL CATSPER, ESPECÍFICO DEL
ESPERMATOZOIDE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELIZABETH CERVANTES IBARRA



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

Ciudad Universitaria, CDMX., 2018



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Cervantes

Ibarra

Elizabeth

044 55 43 53 94 41

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311148152

2. Datos del tutor

Doctor

Arturo

Picones

Medina

3. Datos del sinodal 1

Doctor

Alberto

Darszon

Israel

4. Datos del sinodal 2

Doctora

Claudia Lydia

Treviño

Santa Cruz

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Arlet del Carmen

Loza

Huerta

6. Datos del sinodal 4

Doctor

Enoch

Luis

Baltazar

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de fracciones polipeptídicas de venenos de serpientes (familia Elapidae) como posibles bloqueadores del canal CatSper, específico del espermatozoide.

Número de páginas 59

2018

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías con sede 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 Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación, con el número de proyecto 039/2013.



Agradecimientos técnicos

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del *Biol. Héctor Miguel Cardoso Torres*, quien preparó la biblioteca de 900 fracciones polipeptídicas pertenecientes a venenos de diferentes animales ponzoñosos, dichas fracciones fueron 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*, quien estandarizó el protocolo y programación del equipo para la evaluación de la acción de fracciones polipeptídicas pertenecientes a diferentes venenos sobre espermatozoides humanos con el equipo FlexStation3® en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa).

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del *Dr. Jesús Esteban Pérez Ortega*, quien desarrolló el software DrugSearchWare, el cual permitió analizar de una manera más eficaz los resultados obtenidos del equipo FlexStation3®.

Al *Fis. Cesar Oliver Lara Figueroa*, por el apoyo técnico del presente trabajo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser quien me ha educado y formado desde el 2011 cuando entre al Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Vallejo, a la Facultad de Ciencias quien fue mi segunda casa, quien me formo como profesionista, como la persona que soy actualmente y finalmente agradezco al Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa) por permitirme formar parte de su equipo y por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis dentro de sus instalaciones.

A mi tutor el Dr. Arturo Picones Medina por permitirme formar parte de su laboratorio y aceptarme como su tesista, por compartir sus conocimientos, brindarme su tiempo y apoyarme durante todo el proceso de titulación.

A mis sinodales, que a pesar de ser personas muy ocupadas me brindaron parte de su tiempo para leer y evaluar el presente trabajo. Agradezco sus comentarios, sugerencias y correcciones, ya que gracias a ellas el presente trabajo se vio enriquecido enormemente y sobre todo gracias por transmitirme su conocimiento, sabiduría y prepararme para una vida profesional.

A la Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta por ser mi mentora durante los años que estuve en el LaNCa, por tener la paciencia y la dedicación para enseñarme a realizar los experimentos realizados en la presente tesis y por la confianza que me tuvo para dejarme realizar los experimentos sola.

A los integrantes del LaNCa, les agradezco por las numerosas discusiones, comentarios y sugerencias sobre mi trabajo, las cuales fueron de vital importancia para desarrollar adecuadamente esta tesis, por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por compartir su conocimiento conmigo.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade, por la beca que tuvieron a bien otorgarme durante toda mi etapa escolar, la cual ayudo a enfocarme totalmente en mis estudios y culminar con éxito mi licenciatura.

A mi mamá Margarita Ibarra y a mi papá Eduardo Cervantes por su amor incondicional, por apoyar siempre mis decisiones, por estar incondicionalmente para mí, por la confianza depositada en mí, por inculcarme valores y responsabilidades, por animarme a superarme y a seguir mis sueños, simplemente gracias por ser mis padres, todos mis logros se los debo a ustedes.

A Federico García por impulsarme a estudiar Biología, por apoyarme durante toda la carrera, por inculcarme confianza y darme fuerzas cuando las necesite.

A la familia Ibarra por el gran amor que me han dado, por apoyarme e impulsarme a seguir con mis sueños, por siempre estar presente en mis logros, por todos los bellos momentos juntos y sobre todo por los valores y tradiciones inculcados.

A mi tío Eduardo Ibarra por ser un segundo padre para mí y apoyarme incondicionalmente.

A mi hermana Jessica Cervantes y mis amigos Brenda León, Helen Hernández, Daniela Benítez y Rodrigo Guzmán por su amistad, cariño y comprensión, por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas.

Dedicatoria

A la mujer más fuerte y valiente que he conocido.
A la mejor mujer, la mejor madre, la mejor abuela.
A la mujer que me crio y me guio con su sabiduría.
A mi abuelita María Guadalupe Díaz Galván †.

Índice

1	Resumen	10
2	Abreviaturas	11
3	Introducción	12
3.1	El espermatozoide.....	12
3.2	Fecundación.....	13
3.2.1	Movilidad activada	13
3.2.2	Capacitación.....	14
3.2.3	Movilidad hiperactivada	14
3.2.4	Reacción acrosomal	14
3.2.5	Quimiotaxis.....	15
3.3	El canal iónico CatSper	16
3.3.1	Estructura.....	16
3.3.2	Fisiología y biofísica.....	17
3.3.3	Modulación del Catsper	18
3.4	Acción de toxinas polipeptídicas sobre canales iónicos	21
3.4.1	Acción sobre CatSper.....	22
3.5	Fluorescencia como herramienta para estudiar canales iónicos	23
3.5.1	Técnica de fluorometría automatizada de alto rendimiento	23
3.6	Venenos de serpientes	23
4	Justificación	25
5	Hipótesis	25
6	Objetivos	25
6.1	General.....	25
6.2	Particulares	25
7	Materiales y métodos	26
7.1	Reactivos.....	26
7.2	Obtención de las muestras de semen	27
7.3	Obtención de espermatozoides móviles	27
7.4	Incubación de células con el fluoróforo	27
7.5	Medición de la intensidad de fluorescencia usando el equipo FlexStation3®	28

7.6	Aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG en presencia o ausencia de fracciones polipeptídicas (FPs).....	28
7.7	Cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs.	28
7.8	Controles internos.....	29
7.9	Compuestos a ensayar	30
7.10	Análisis de datos	30
7.11	Análisis estadístico.....	31
8	Resultados	32
8.1	Primer tamizaje: Medición del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG	33
8.1.1	<i>Ophiophagus Hannah</i>	33
8.1.2	<i>Walterinesia aegyptia</i>	35
8.1.3	<i>Bungarus multicinctus</i>	36
8.1.4	<i>Naja haje</i>	36
8.1.5	<i>Naja annulifera</i>	37
8.1.6	<i>Naja siamensis</i>	37
8.1.7	<i>Naja nivea</i>	38
8.1.8	<i>Naja kaouthia</i>	38
8.1.9	<i>Naja pallida</i>	39
8.1.10	<i>Naja nigricollis</i>	40
8.1.11	<i>Naja melanoleuca</i>	40
8.1.12	<i>Naja oxiana</i>	41
8.1.13	<i>Naja nubiae</i>	41
8.1.14	<i>Naja mossambica</i>	42
8.2	Primer tamizaje: Medición del cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs	44
8.3	Segundo tamizaje: Medición del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG.....	46
9	Discusión	48
10	Conclusiones	53
11	Perspectivas	53
12	Apéndices	54
12.1	APÉNDICE 1: Análisis estadístico de controles	54
13	Bibliografía	56

Índice de figuras y tablas

Figura 1. <i>Morfología del espermatozoide</i>	12
Figura 2. <i>Diagrama del sistema reproductor femenino humano</i>	15
Figura 3. <i>Estructura del canal CatSper</i>	17
Figura 4. <i>Posibles proteínas involucradas en el funcionamiento y regulación del canal CatSper humano</i>	19
Figura 5. <i>Blancos de toxinas de diferentes animales</i>	22
Tabla 1. <i>Taxonomía correspondiente a la familia de serpientes Elapidae</i>	24
Figura 6. <i>Estructura química del Fluo4-AM</i>	26
Figura 7. <i>Estructura química de la progesterona</i>	26
Figura 8. <i>Estructura química de la ionomicina</i>	26
Figura 9. <i>Estructura química del mibefradil</i>	26
Figura 10. <i>Medición de la intensidad de fluorescencia usando el equipo FlexStation3® y normalización de los datos</i>	29
Tabla 2. <i>Lista de serpientes utilizadas para realizar los tamizajes de FPs</i>	33
Figura 11. <i>Primer tamizaje. Efecto de diferentes FPs sobre las respuestas a la PG en espermatozoides humanos</i>	34
Figura 12. <i>FPs del veneno de <i>O. bannah</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	35
Figura 13. <i>FPs del veneno de <i>W. aegyptia</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	35
Figura 14. <i>FPs del veneno de <i>B. multicinctus</i> no afectan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	36
Figura 15. <i>FPs del veneno de <i>Naja haje</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	36
Figura 16. <i>FPs del veneno de <i>Naja annulifera</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	37
Figura 17. <i>FPs del veneno de <i>Naja siamensis</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	37
Figura 18. <i>FPs del veneno de <i>Naja nivea</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	38
Figura 19. <i>FPs del veneno de <i>Naja kaouthia</i> afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	39
Figura 20. <i>FPs del veneno de <i>Naja pallida</i> afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	39
Figura 21. <i>FPs del veneno de <i>Naja nigricollis</i> potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	40
Figura 22. <i>FPs del veneno de <i>Naja melanoleuca</i> afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	40
Figura 23. <i>FPs del veneno de <i>Naja oxiana</i> no afectan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	41
Figura 24. <i>FPs del veneno de <i>Naja nubiae</i> disminuyen el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	42
Figura 26. <i>Fracción 34.5 del veneno de <i>Naja mossambica</i> muestra una relación Dosis-Efecto al disminuir el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	43
Figura 25. <i>FPs del veneno de <i>Naja mossambica</i> disminuyen el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG</i>	43
Figura 27. <i>Efecto de diferentes FPs sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en espermatozoides humanos</i>	44
Figura 28. <i>Relación Dosis-Efecto del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal en presencia de la FP N. mossambica 34.5</i>	45
Figura 29. <i>Segundo tamizaje. Efecto de diferentes FPs sobre la respuesta a la PG en espermatozoides humanos</i>	46
Figura 30. <i>Relaciones Dosis-Efecto de la FPs N. mossambica 11 (34-35,20)</i>	47
Figura 31. <i>Ejemplo de la estadística seguida para los controles</i>	54
Figura 32. <i>Gráfica que muestra espacialmente la intensidad de fluorescencia de cada control</i>	54
Figura 33. <i>Gráfica que ejemplifica el cálculo del factor Z'</i>	55

1 Resumen

El canal iónico CatSper es exclusivo de los espermatozoides y es el principal canal por el cual entran los iones calcio (Ca^{2+}) al flagelo de los espermatozoides. Este canal se activa en presencia de la progesterona (PG; hormona esteroidea secretada por los cuerpos lúteos y las células del cúmulo que rodean al ovocito), lo cual ocasiona un aumento transitorio de Ca^{2+} seguido por un aumento sostenido, este aumento de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los espermatozoides desencadena múltiples respuestas fisiológicas necesarias para la fecundación, entre ellas, la hiperactivación, la reacción acrosomal y la quimiotaxis.

Dada la alta potencia y selectividad farmacológica de las fracciones polipeptídicas (FPs) procedentes del veneno de animales ponzoñosos sobre canales iónicos, es posible identificar alguna(s) de ellas capaz(es) de actuar como bloqueadores del canal CatSper. Por lo anterior mencionado se analizaron 245 FPs provenientes de venenos de distintos géneros de serpientes de la familia Elapidae para la identificación de un compuesto que inhibiera específicamente al canal CatSper al estimularlo con progesterona. La identificación de un agente farmacológico con estas características podría sentar las bases para el potencial desarrollo de un principio activo para un anticonceptivo masculino no hormonal y reversible.

Las FPs se incubaron con espermatozoides humanos cargados previamente con el indicador de calcio intracelular Fluo4-AM, el cambio en la intensidad de fluorescencia para la detección del flujo de Ca^{2+} fue analizado mediante ensayos de alto rendimiento o HTS por sus siglas en inglés (high-throughput screening) con el equipo FlexStation3® (Molecular Devices, USA). De las 245 FPs analizadas a una $[6.7 \mu\text{g}/\text{ml}]$, solo el 1.22% de los compuestos (3/245 FPs) provocaron una disminución estadísticamente significativa del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PG; estas fracciones, denominadas “HITS” fueron: ***N. mossambica* 23.1, 34.5** y ***N. nubiae* 21.4**. Posteriormente se evaluaron los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal inducido por la sola incubación de los “HITS” mencionados anteriormente. Finalmente se determinó la dependencia con la concentración del efecto de estos “HITS” sobre los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la PG.

Al analizar la dependencia con la concentración de los “HITS” solo la fracción ***N. mossambica* 34.5** mostró una relación Dosis-Efecto dependiente de la dosis (concentración). Sin embargo, esta FP no disminuye totalmente el flujo de Ca^{2+} en respuesta a la PG.

Adicional a este descubrimiento, también se encontraron 38 FPs (15.5% del total de los compuestos analizados) capaces de potencializar el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. A pesar de que el objetivo de este trabajo no era encontrar FPs que potencializaran la respuesta a la PG, estas FPs son de gran importancia, ya que podrían concebirse como posibles potenciadores de la movilidad de espermatozoides para un futuro análisis.

2 Abreviaturas

[Ca²⁺]_i: Concentración intracelular del ion Ca²⁺

[Na⁺]_i: Concentración intracelular del ion Na⁺

1AG: 1-araquidonilglicerol

2AG: 2-araquidonilglicerol

3FTx: Toxinas de tres dedos

ABHD2: serina hidrolasa llamada ABHD2

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AGs: Araquidonilgliceroles

Ca²⁺: Ion calcio

Ca_v: Canal(es) de calcio dependiente(s) de voltaje

CatSper: Canal catiónico del espermatozoide (por sus siglas en inglés)

FP: Fracción polipeptídica

FPs: Fracciones polipeptídicas

H⁺: Protones

HCO₃⁻: Bicarbonato

HTS: Ensayos de alto rendimiento (por sus siglas en inglés High-throughput screening)

I_{CatSper}: Corriente catiónica monovalente del canal CatSper

IBT: Instituto de Biotecnología de la UNAM

IP3: Inositol trifosfato

K⁺: Ion potasio

kDa: Kilo Dalton

K_v: Canal(es) de potasio dependiente(s) de voltaje

LaNCa: Laboratorio Nacional de Canalopatías

Mb: Mibefradil

MRH: Medio de Registro Humano

mSH: Serina hidrolasa metabólica

Na_v: Canal(es) de sodio dependiente(s) de voltaje

OMS: Organización Mundial de la Salud

PG: Progesterona

PGE1: Prostaglandina E1

pH: Potencial de hidrogeno

pHi: pH intracelular

rB: Respuesta basal

rPG: Respuesta a progesterona

rPG/Mb: Respuesta a progesterona en presencia de bloqueador

RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta

Presión en Fase Reversa (por sus siglas en inglés)

Vm: Potencial eléctrico de membrana

Zn: Zona pelúcida

3 Introducción

3.1 El espermatozoide

El espermatozoide humano es la célula sexual masculina altamente especializada, caracterizada por ser haploide y tener bajo contenido citoplasmático. La única función de esta célula es llegar al óvulo para fecundarlo, introducir su material genético y formar un nuevo individuo. Su morfología consta de una cabeza y un flagelo que le permite a la célula desplazarse.

En la cabeza se encuentra el núcleo sumamente compactado debido al recambio de histonas por protaminas, la vesícula acrosomal que ocupa dos terceras partes de la cabeza (**Figura 1**) y un centríolo ubicado en la parte basal. La forma de la cabeza es característica de cada especie, en el caso de los espermatozoides humanos es ovalada, plana y alargada.

La cola o el flagelo se divide en las piezas media, principal y terminal (**Figura 1**), en la pieza media es donde se agrupan las mitocondrias en forma de hélice. En las piezas media y principal se localiza el axonema, el cual consta de 9 pares de microtúbulos posicionados de forma circular y un par central, cada microtúbulo proyecta dos brazos de dineínas, uno interno y otro externo, estos últimos son los responsables de la fuerza motriz del flagelo. Además, se encuentran 9 radios provenientes de los microtúbulos periféricos proyectados hacia el par central (Turner, 2006; Olivera *et al.*, 2006).

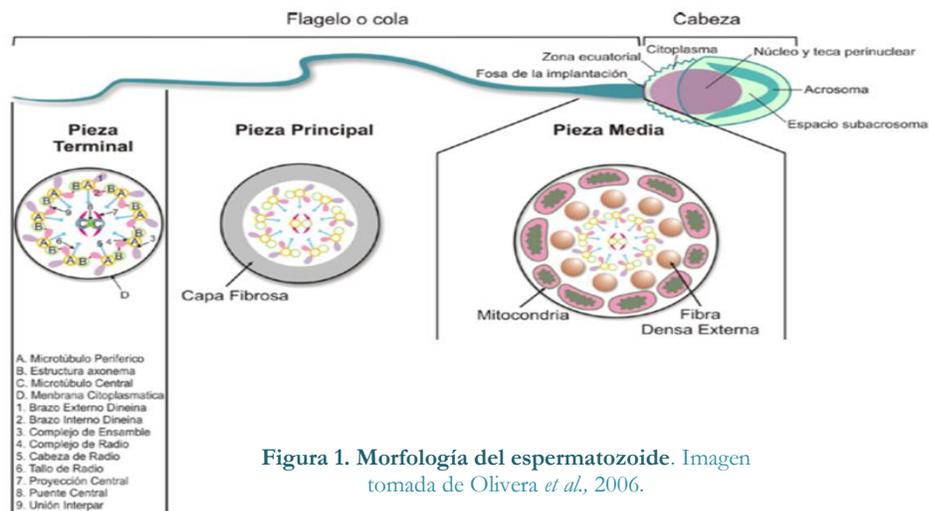


Figura 1. Morfología del espermatozoide. Imagen tomada de Olivera *et al.*, 2006.

Los espermatozoides cuentan con sofisticados mecanismos moleculares, los cuales le dan la capacidad de navegar por el tracto reproductor femenino exitosamente. Los principales mecanismos involucran la activación de canales iónicos y los transportadores, que a su vez se encargan de detectar el ambiente donde se encuentran y adaptar la movilidad del espermatozoide, esto se controla parcialmente por la producción de ATP, la homeostasis iónica, la alcalinidad intracelular, la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y el potencial eléctrico (voltaje) de membrana (V_m).

Algunos de estos canales iónicos y transportadores se expresan exclusivamente en células espermáticas y en espermatozoides maduros, lo cual las convierte en el blanco ideal para atacarlas farmacológicamente y desarrollar un contraceptivo o anticonceptivo masculino. Algunos de estos blancos son el canal catiónico CatSper, que es indispensable para la fecundación tanto en ratones (Avenarius *et al.*, 2009) como en humanos y el canal de potasio KSper (Lishko, 2016). Con respecto al canal KSper existe controversia si en humanos este canal se encuentra conformado por Slo3, Slo1 o ambos (Sánchez-Carranza *et al.*, 2015).

3.2 Fecundación

La fecundación es, quizás, el evento biológico más importante de las especies con reproducción sexual, donde los gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (óvulos o huevos) se encuentran y se fusionan para formar un nuevo individuo con material genético derivado de ambos padres. Este proceso se divide en cuatro etapas principales (Gilbert, 2000):

1. Contacto y reconocimiento entre espermatozoide y óvulo
2. Regulación de la entrada de espermatozoides en el óvulo
3. Fusión del material genético de los gametos
4. Activación del metabolismo del óvulo para comenzar el desarrollo

Parte clave del lenguaje funcional entre gametos son los flujos iónicos, los cuales son mediados por canales iónicos. Gracias a estos canales los gametos se pueden comunicar e influir el uno sobre el otro (Darszon, 2007). Los canales iónicos son proteínas transmembranales capaces de formar un poro acuoso que permite el flujo de partículas cargadas eléctricamente y libres en solución (iones) de manera regulada y con gran eficiencia ($\sim 10^7$ iones/s). Este flujo de iones entre el ambiente intracelular y extracelular produce actividad eléctrica que permite la transmisión de señales. Estos canales se pueden regular por voltaje, por la unión de ligandos o por estímulos físicos como la temperatura o el estrés mecánico (Neher & Sakmann, 1992; Hille, 2001).

Por otro lado, antes de que los gametos se encuentren, cada uno por separado lleva a cabo diferentes procesos. En este trabajo nos centraremos únicamente en el gameto masculino, donde los flujos iónicos regulan la respiración celular del espermatozoide, su movilidad (como nada el espermatozoide) y la capacidad para fecundar al óvulo.

3.2.1 Movilidad activada

La movilidad de los espermatozoides de mamíferos se activa cuando estos son eyaculados en el tracto genital femenino, en esta condición las células nadan de forma casi recta, mostrando un batido flagelar rítmico, simétrico y con baja curvatura. Este movimiento flagelar es necesario para que el espermatozoide inicie su viaje por el tracto genital femenino y logre llegar a la unión uterotubal (**Figura 2 B1**) (Turner, 2006; Darszon *et al.*, 2006, 2011).

Este tipo de movimiento se estimula y regula por la fosforilación/desfosforilación de proteínas flagelares, lo que da como resultado la flexión del axonema, ya que, al fosforilarse los brazos de dineína, la dineína ATPasa se activa, se da la hidrólisis de ATP y los brazos de dineína interactúan entre los pares de microtúbulos, ocasionando que los microtúbulos se deslicen entre ellos.

Debido a que el axonema se encuentra anclado a la base de la cabeza, el deslizamiento de microtúbulos se traduce en un movimiento ondulatorio del flagelo (Turner, 2006; Darszon *et al.*, 2006).

3.2.2 Capacitación

Los espermatozoides recién depositados en el tracto genital femenino son infértiles, en el caso de los espermatozoides humanos tienen que transcurrir alrededor de tres horas en el tracto para terminar su maduración (Lishko, 2016) y después comenzar la competencia para fecundar al ovulo, a este proceso de maduración se le llama capacitación (Figura 2 B2). Para lograr una capacitación *in vitro* se requiere de tres componentes esenciales en el medio: calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-) y albumina de suero bovino (Darszon *et al.*, 2006).

Esta maduración se ha asociado a la reducción del contenido de colesterol que resulta en una disminución en la rigidez de la membrana plasmática y re-arreglos y/o modificaciones en el contenido de lípidos y proteínas de esta membrana. Adicionalmente, el Vm cambia, ya que los espermatozoides de mamíferos capacitados se hiperpolarizan, se alcaliniza el pH intracelular (pH_i) y aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular, así como la permeabilidad a potasio (K^+) y los niveles de segundos mensajeros como AMPc (adenosín monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) y diacilglicerol (Darszon *et al.*, 2006; Darszon, 2007; López-González *et al.*, 2014).

3.2.3 Movilidad hiperactivada

La movilidad hiperactivada o hiperactivación ocurre durante la capacitación y se caracteriza por un patrón del movimiento flagelar asimétrico que ocurre al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este modo de batido flagelar permite un movimiento progresivo del espermatozoide en fluidos de alta viscosidad. Los canales de Ca^{2+} involucrados en esta respuesta fisiológica, son el canal de membrana plasmática CatSper y los canales de Ca^{2+} de pozas internas IP_3R y RyR (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015).

En esta condición el movimiento cambia pasando de un patrón rítmico, simétrico y con baja curvatura, nadando de forma casi recta, a flexiones asimétricas amplias, rápidas y vigorosas, las cuales son necesarias para liberarse de las criptas oviductales para poder avanzar a través del lumen y alcanzar el útero y así se logra dar la fecundación. La hiperactivación le permite al espermatozoide llegar hasta el óvulo, atravesar las células del cúmulo ooforo (células de la granulosa que rodean el ovocito) y posicionarse en la zona pelúcida (ZP) (Figura 2 B3). Finalmente el reconocimiento entre gametos ocurre cuando las membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito se unen y fusionan (Olivera *et al.*, 2006; Avenarius *et al.*, 2009; Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Lishko, 2016).

3.2.4 Reacción acrosomal

Este proceso es un prerrequisito para que el espermatozoide logre fecundar al óvulo (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014). Consiste en la fusión de la membrana acrosomal y la membrana plasmática del espermatozoide en múltiples sitios, lo que ocasiona la liberación de enzimas líticas (necesarias para penetrar la capa externa del óvulo) presentes en la vesícula acrosomal. Durante este proceso el espermatozoide también expone nuevos componentes de membrana requeridos para que se

fusiona con el óvulo (Figura 2 B5). Dicha vesícula se deriva del aparato de Golgi y se encuentra localizada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide (Vacquier, 1998; Olivera *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2006, 2011).

La reacción acrosomal está orquestada por cambios de permeabilidad iónica que requiere de Ca^{2+} externo, por esto, a su vez, es estrictamente dependiente del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, de un aumento en el pH_i y de cambios en el V_m. (Darszon *et al.*, 2011; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014).

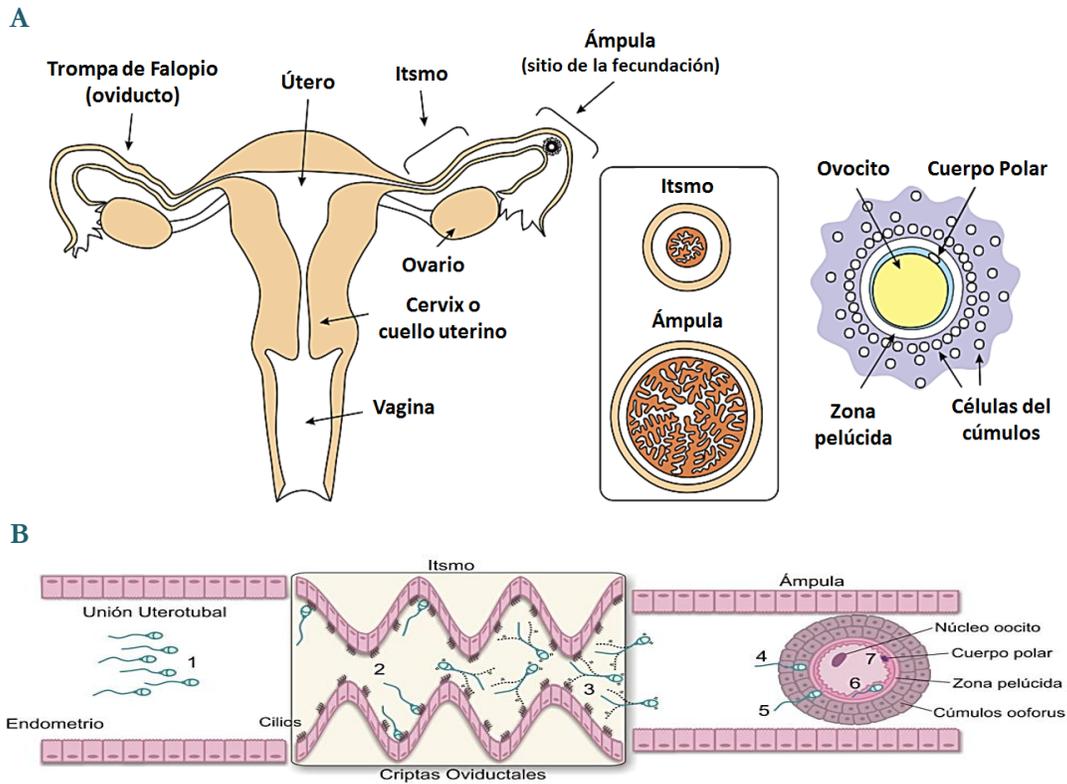


Figura 2. Diagrama del sistema reproductor femenino humano. A) A la izquierda se muestra la arquitectura y partes que componen al tracto reproductor femenino. En medio se muestra un corte transversal de las regiones del itsmo y el ampulla donde se muestran las numerosas invaginaciones de estos segmentos. A la derecha se observa el diagrama de un ovocito, la zona pelúcida y las células del cúmulo ooforus. Imagen modificada de Darszon *et al.*, 2011. **B)** Secuencia de los procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra: 1. Activación. 2. Capacitación. 3. Hiperactivación. 4. Reconocimiento entre gametos. 5. Reacción acrosomal. 6. Adhesión y 7. Fusión. Imagen tomada de Olivera *et al.*, 2006.

3.2.5 Quimiotaxis

La quimiotaxis es la habilidad de ciertas células u organismos para determinar la dirección de su locomoción a lo largo de un gradiente de sustancias atrayentes o repelentes (Rojas *et al.*, 2009). Este fenómeno de quimiotaxis se da en los espermatozoides, ya que se descubrió que el fluido folicular atrae a los espermatozoides capacitados. Se ha demostrado que los espermatozoides de mamíferos expresan receptores olfatorios sensibles a los odorantes, uno de estos receptores “hOR17-4” se detectó en ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario) testicular humano y su agonista bourgeonal ($C_{13}H_{18}O$) funciona como quimioattractor, la respuesta a este

compuesto inicia en la pieza media y en segundos viaja a la cabeza, en consecuencia, el bourgeonal eleva la $[Ca^{2+}]_i$ (Olivera *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012).

El bourgeonal es un odorante que aparentemente no se encuentra en el tracto reproductor femenino, sin embargo, se cree que puede imitar la función de un agonista natural no identificado. Por otro lado se ha reportado que el líquido folicular solo atrae alrededor del 10% de la población de espermatozoides, lo que sugiere que existen diferentes mecanismos de señalización o que la concentración de agonistas naturales en el líquido folicular es muy baja (Darszon *et al.*, 2011).

Al realizar experimentos in vitro se ha visto que la progesterona (PG) a bajas concentraciones (1 a 100 pmol/L) actúa como un quimioattractor de los espermatozoides de mamíferos capacitados, se cree que de manera in vivo la PG también actúa como un quimioattractor, donde el gradiente es generado por las células de cúmulos ooforus, las cuales secretan dicha hormona después de la ovulación (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2008).

3.3 El canal iónico CatSper

El canal catiónico del espermatozoide (CatSper por sus siglas en inglés) es un canal permeable a Ca^{2+} , dependiente del pH, ligeramente dependiente de voltaje, exclusivo de los espermatozoides y es el principal canal de calcio de estas células (Lobley *et al.*, 2003; Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2016). El canal CatSper se encuentra localizado en la pieza principal del flagelo (Kirichok *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011). En ausencia de cationes divalentes, como lo es el calcio, puede conducir cationes monovalentes como sodio (Na^+) y cesio (Cs^+) (Darszon *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015).

3.3.1 Estructura

El canal funcional Catsper se forma por el ensamble de 4 subunidades α (alfa) separadas (las cuales forman el poro permeable) y 5 subunidades auxiliares CatSper β (beta), CatSper γ (gamma), CatSper δ (delta) (Figura 3) (Kirichok *et al.*, 2006; Ren & Xia, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012; Singh & Rajender, 2015; Miller *et al.*, 2016), CatSper ϵ (épsilon) y CatSper ζ (zeta) (Chung *et al.*, 2017).

Cada subunidad α (CatSper 1-4) cuenta con seis segmentos transmembranales (S1-S6). Las subunidades 1 y 2 son parecidas a aquellas de los canales catiónicos regulados por voltaje, ya que el cuarto segmento tiene varios residuos cargados positivamente (Arginina/Lisina), lo anterior explica la ligera dependencia con el voltaje de este canal. Sumado a esto, se ha descrito que CatSper 1 cuenta con un dominio terminal citoplasmático grande, rico en histidina, que suele variar en longitud y secuencia entre especies e incluso entre distintos primates (Lobley *et al.*, 2003; Ren & Xia, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015).

Se han localizado los genes que codifican a las subunidades α en cromosomas de ratones: la subunidad 1 se encuentra localizada en el cromosoma 19, consta de 12 exones y codifica para una proteína de 686 aminoácidos, la subunidad 2 se descubrió en el cromosoma 2 y codifica para una proteína de 588 aminoácidos, la subunidad 3 se encuentra en el cromosoma 13 y codifica

para un polipéptido de 295 aminoácidos y la subunidad 4 se encuentra en el cromosoma 4 y codifica para una proteína de 442 aminoácidos (Navarro *et al.*, 2008).

Con respecto a las subunidades auxiliares, CatSper β es una proteína de 126 kDa (kilo Dalton) que cuenta con dos segmentos transmembranales, dos extremos terminales citoplasmáticos cortos y un dominio extracelular grande. La proteína CatSper γ es de 131 kDa con un único segmento transmembranal que tiene un parte extracelular grande y una cola citoplasmática corta (Ren & Xia, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015).

El hecho de que algunas subunidades de CatSper tengan grandes dominios extracelulares sugiere que posiblemente se modulen por señales externas tales como ligandos, interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y/o en el tracto genital femenino (Darszon *et al.*, 2011).

La subunidad CatSper δ cuenta con un solo segmento transmembranal (Darszon *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015) con una topología similar a la de CatSper γ , sin embargo, ratones transgénicos que no cuentan con CatSper δ son infértiles debido a defectos en la hiperactivación, por lo cual la expresión de esta subunidad auxiliar es esencial para que el canal CatSper pueda ser funcional (Darszon *et al.*, 2011). CatSper ϵ comparte homología con CatSper δ en el extremo COOH-terminal (Chung *et al.*, 2017).

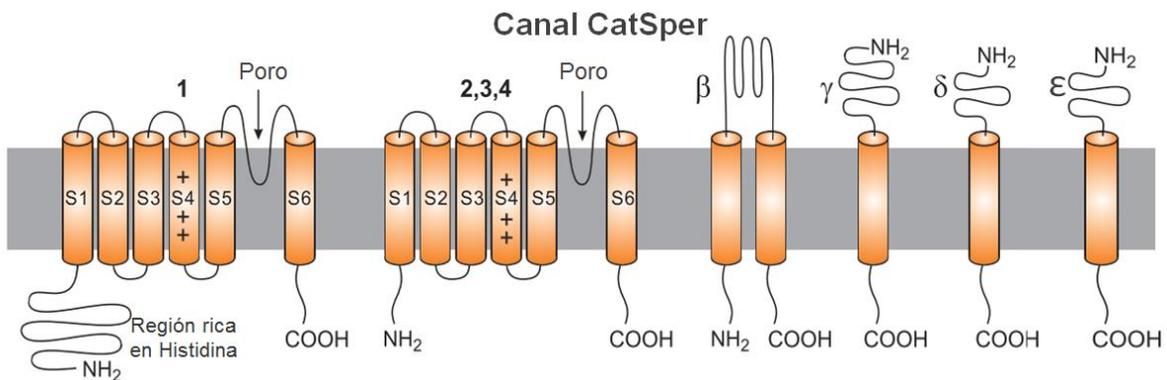


Figura 3. Estructura del canal CatSper. A la izquierda se observa la topología de la proteína CatSper 1, la cual muestra seis segmentos transmembranales (S1-S6), el cuarto segmento transmembranal contiene residuos cargados positivamente, el asa del poro y los extremos citoplasmáticos terminales COOH y NH₂, el extremo amino cuenta con una región rica en histidina. En la parte media se ejemplifican las subunidades 2-4, las cuales tienen la misma arquitectura que la subunidad 1 con excepción de que carecen de la región rica en histidina. A la derecha se muestra la topología de cuatro subunidades auxiliares: CatSper β , CatSper γ , CatSper δ y CatSper ϵ . La subunidad CatSper ζ no se ejemplifica en esta imagen. Imagen modificada de Darszon *et al.*, 2011

La proteína auxiliar CatSper ζ es exclusiva de mamíferos y está involucrada de manera importante en la funcionalidad del complejo CatSper. Ratones mutantes que carecen de esta subunidad dejan pasar una menor cantidad de iones Ca²⁺, ocasionando que el flagelo se vuelva más rígido, lo que evita que se mueva de manera eficiente en el tracto reproductor de la hembra y disminuye la capacidad de estos espermatozoides para penetrar el óvulo (Chung *et al.*, 2017).

3.3.2 Fisiología y biofísica

Hasta la fecha, no se ha podido expresar al canal CatSper en sistemas heterólogos, lo cual ha dificultado su caracterización biofísica completa (Lobley *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Darszon *et al.*, 2011), sin embargo, se han hecho grandes avances al estudiar espermatozoides o

células espermáticas provenientes de ratones y espermatozoides maduros de humanos (Navarro *et al.*, 2008; Avenarius *et al.*, 2009). Además, otro factor importante para lograr estudiar y comprender el funcionamiento de CatSper ha sido la utilización de compuestos capaces de bloquear al canal (NNC55-0396 y Mibefradil) (Mansell *et al.*, 2014).

Por otro lado, al examinar la corriente catiónica monovalente del canal CatSper, definida como I_{CatSper} , diversos investigadores se dieron cuenta que esta corriente se origina específicamente en la pieza principal del flagelo, es una corriente selectiva a Ca^{2+} bajo condiciones fisiológicas y se ve altamente potencializada por una alcalinización intracelular (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Se especula que el dominio NH_2 -terminal rico en histidina de la subunidad CatSper 1 está involucrado en esta potencialización al actuar como un sensor de pH (Kirichok *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2011).

Es importante destacar que por medio de este canal se produce el influjo transmembranal de Ca^{2+} en los espermatozoides, lo cual, conduce a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este aumento es indispensable para que se dé la hiperactivación y otros fenómenos fisiológicos necesarios para que el espermatozoide sea fértil y logre realizar la fecundación. Esto se ha comprobado con ratones mutantes nulos, los cuales, al carecer de cualquier isoforma de CatSper, son infértiles; asimismo, mutaciones de las subunidades 1 y 2 en humanos se han asociado con una reducción en la movilidad de los espermatozoides (astenozoospermia) y muchas formas anormales de espermatozoides (teratozoospermia); estas anomalías suelen aparecer en conjunto denominándose astenoteratozoospermia (Avenarius *et al.*, 2009; Dohle *et al.*, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Singh & Rajender, 2015).

Se ha reportado que la subunidad CatSper 1 es indispensable para penetrar la ZP y lograr fecundar al óvulo, ya que los espermatozoides de ratones que carecen de esta subunidad no logran penetrar la ZP, sin embargo, sí pueden fecundar ovocitos libres de la ZP (Avenarius *et al.*, 2009). Esta subunidad también influye de manera importante en la hiperactivación del espermatozoide, puesto que al comparar células normales contra células nulas de CatSper 1 se observó que el batido flagelar de las últimas permanecía rítmico, simétrico y con baja curvatura aun en un medio capacitante, lo cual le impide a estas células seguir migrando hacia la región ampular al quedar atrapadas en las criptas oviductales (Ho *et al.*, 2009; Darszon *et al.*, 2011).

Estos hallazgos quedan como antecedentes para establecer que CatSper juega un papel crucial en la fecundación, tanto para que se dé el fenómeno de hiperactivación como para poder superar las capas del óvulo (Darszon *et al.*, 2011).

3.3.3 Modulación del Catsper

Estudios anteriores reportan que; diversos factores pueden modular al canal CatSper potencializando la I_{CatSper} y por ende conducir a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los espermatozoides. Estos factores capaces de activar al canal son las prostaglandinas, los odorantes, la progesterona (PG) o la alcalinización del pH intracelular (Schaefer *et al.*, 1998; Darszon *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2016).

Las prostaglandinas, la PG y los odorantes producen una respuesta bifásica similar, la cual consiste en un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rápido y transitorio, seguido por una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

pequeña, lenta y sostenida (Strünker *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012). Se cree que esta respuesta sostenida se debe a la liberación de Ca^{2+} proveniente de pozas internas (Publicover *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha propuesto que el canal CatSper en humanos también necesita de otras proteínas y moléculas del espermatozoide para su funcionamiento y regulación (Figura 4) (Singh & Rajender, 2015), un ejemplo de esto, es el modelo sugerido a continuación:

- El equilibrio de Ca^{2+} dentro del flagelo depende de la ATPasa de Ca^{2+} (bomba de iones de Ca^{2+} adenosis trifosfatasa) encargada de sacar iones Ca^{2+} al exterior celular e importar protones (H^+) al citoplasma y de las bombas en pozas internas (Singh & Rajender, 2015).
- Salida de H^+ mediada por el canal Hv1 (canal de H^+ regulado por voltaje) evitando que el citoplasma flagelar se acidifique, esta exportación también podría alcalinizar el pH_i (Singh & Rajender, 2015; Miller *et al.*, 2015).
- El canal KSper encargado de mantener el Vm en la membrana flagelar y de hiperpolarizar a los espermatozoides durante la capacitación (Singh & Rajender, 2015; Miller *et al.*, 2015). Este canal en humanos es inhibido por la PG, lo cual puede ocasionar que el espermatozoide se despolarice y por consiguiente se facilite la activación de CatSper (Mannowetz *et al.*, 2013).

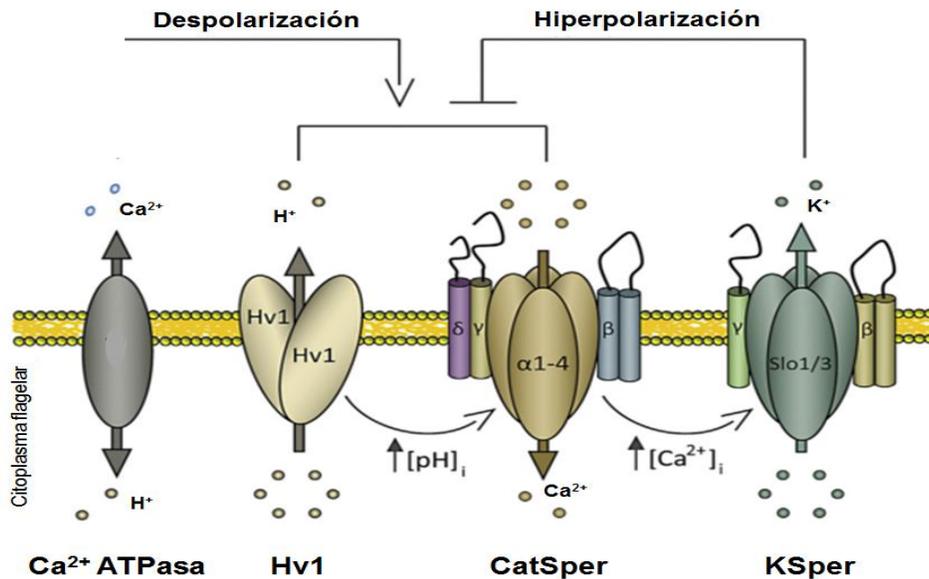


Figura 4. Posibles proteínas involucradas en el funcionamiento y regulación del canal CatSper humano. Gracias a las bombas de Ca^{2+} ATPase, encargadas de exportar iones Ca^{2+} al exterior celular e importar H^+ al citoplasma, se mantiene el equilibrio de Ca^{2+} dentro del flagelo. El canal Hv1 se encarga de exportar H^+ al medio extracelular. A través del canal CatSper entra Ca^{2+} al espermatozoide. Se ejemplifica al canal KSper de ratón, ya que la identidad del Ksper humano aún está en debate, este canal tanto en humano como en ratón se encarga de mantener el Vm en la membrana flagelar al exportar iones K^+ al exterior celular, sin embargo, solo el KSper humano parece ser sensible a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los canales Hv1 y CatSper parecen responder a la despolarización de la membrana, esta despolarización podría lograrse mediante la inhibición de KSper. CatSper puede ser activado por una alcalinización del pH_i, la cual podría ser ocasionada por el canal Hv1. Imagen modificada de Miller *et al.*, 2015.

3.3.3.1 Activación de CatSper inducido por progesterona

La PG es una hormona esteroidea secretada por los cuerpos lúteos y las células del cúmulo que rodean al ovocito (Darszon *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2016). El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG es dependiente del calcio extracelular y ocurre en un tiempo <50 ms, sin embargo, también se cree que puede estar involucrada la liberación de calcio desde pozas internas (Darszon *et al.*, 2011).

Lishko, Botchkina y Kirichok en el 2011 demostraron que “la corriente activada por PG es mediada por CatSper y altamente potencializada por una alcalinización intracelular. Esto lo comprueban al realizar pruebas electrofisiológicas donde descubren que la corriente de CatSper y la corriente activada por PG tienen propiedades idénticas y que al aplicar el inhibidor NNC55-0396 (caracterizado inicialmente como inhibidor de canales de Ca^{2+} tipo T, actualmente se sabe que también bloquea al canal CatSper) se bloquean ambas corrientes” (Lishko *et al.*, 2011).

Durante el paso del espermatozoide en el tracto genital femenino hasta llegar al sitio donde se lleva a cabo la fecundación, estas células detectan el gradiente de la PG liberada por el óvulo. La unión de la PG a una hidrolasa en el espermatozoide induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$; desencadenando múltiples respuestas fisiológicas esenciales para la fecundación, entre ellas, la hiperactivación del flagelo, la reacción acrosomal y la quimiotaxis (Ren & Xia, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2016).

Para corroborar si la PG se une directamente al CatSper o de manera indirecta a un blanco separado de este canal, Miller y colaboradores en el 2016 inhibieron farmacológicamente la serina hidrolasa metabólica (mSH). Eligieron esta enzima porque participa en el metabolismo de los fosfolípidos y endocannabinoides y la PG al unirse a un blanco separado del canal CatSper inicia la señalización de lípidos dentro de la membrana plasmática del espermatozoide, lo cual conduce a la activación de CatSper. Al inhibir mSH se eliminó la activación del CatSper y los cambios de la movilidad inducidos por la PG, sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la actividad basal de CatSper (Miller *et al.*, 2016).

Todo lo anterior respalda la idea de que la PG actúa de manera indirecta sobre el canal. Otra prueba que respalda esta idea es que al realizar una extracción de la mSH por “western blot” (técnica utilizada para identificar proteínas específicas en una mezcla de diferentes proteínas) no se encontró ninguna subunidad del canal CatSper, por otro lado, es importante mencionar que la prostaglandina E1 (PGE1) actúa de manera normal sobre CatSper incluso al inhibirse previamente la mSH, lo cual indica que posiblemente tenga un efecto directo sobre el canal (Miller *et al.*, 2016).

Anterior a este descubrimiento se demostró que los endocannabinoides son sustratos de mSH (Long & Cravatt, 2011). Al evaluar de manera extracelular la familia de los endocannabinoides, se encontró que solo el 1-araquidonilglicerol (AG1) y 2-araquidonilglicerol (AG2) inhiben la $I_{CatSper}$, lo cual indica que probablemente las colas hidrófobas de los araquidonilgliceroles (AGs) sean las responsables de tener un efecto sobre CatSper (Miller *et al.*, 2016).

Miller y colaboradores en el 2016 observaron que las AGs se encuentran en grandes cantidades en la membrana plasmática de los espermatozoides humanos y mantienen a CatSper cerrado. La

cantidad de AGs se reduce drásticamente al estimular con PG, lo cual parece indicar que la PG actúa a través de la mSH para eliminar los AGs de la membrana plasmática (Miller *et al.*, 2016).

Se identificaron dos posibles candidatos pertenecientes a una gran familia de mSH: 1 hidrolasa amida de ácido graso (FAAH) y ABHD2. La primera de estas hidrolasas se descartó, ya que al hacer pruebas electrofisiológicas inhibiendo FAAH y añadiendo su sustrato nativo AEA no cambia I_{CatSper} , lo que sugiere que ni la inhibición ni la activación de esta mSH afecta a CatSper (Miller *et al.*, 2016).

Por otro lado, ABHD2 es una molécula de 425 aminoácidos con un dominio transmembranal y uno extracelular que se encuentra presente en el espermascriptoma humano, por lo cual se expresa de manera funcional a nivel de ARNm en el espermatozoide humano. También se encuentra confinado al mismo compartimiento celular donde se encuentra el CatSper, esto es en la pieza principal del flagelo. El grupo de Miller realizó experimentos para confirmar que ABDH2 se encuentra en el flagelo del espermatozoide y se une de manera específica a la PG. La inactivación de esta mSH suprimió el flujo de calcio activado por PG en los flagelos analizados (Miller *et al.*, 2016).

Lo anterior parece indicar que la activación del canal CatSper comienza por la unión de la PG a su receptor no genómico ABHD2, al darse esta unión se elimina al inhibidor endógeno endocannabinoide araquidonilglicerol de la membrana del espermatozoide. Por lo anterior, este evento es el responsable de la hiperactivación de los espermatozoides y por lo tanto vital para la fertilidad de estas células (Miller *et al.*, 2016).

Por último, se cree que la membrana plasmática de los espermatozoides también debe tener un mecanismo de retroalimentación para la inactivación del CatSper, este puede consistir en que se estén produciendo constantemente AGs para mantener cerrado al CatSper (Miller *et al.*, 2016).

3.4 Acción de toxinas polipeptídicas sobre canales iónicos

Los venenos biológicos son sustancias nocivas producto del metabolismo de un organismo vivo, cuya función es incapacitar a su presa o lograr defenderse de sus depredadores. Los venenos generalmente contienen sales inorgánicas, pequeñas moléculas orgánicas y una amplia gama de proteínas de alto peso molecular, incluidas las enzimas, sin embargo, los péptidos bioactivos ricos en cisteína (<50 residuos de aminoácidos) y los polipéptidos (50-100 residuos) son los componentes más abundantes que se encuentran en estas secreciones tóxicas. Muchos de estos compuestos polipeptídicos presentan una alta afinidad química por una diversidad de canales iónicos. El término más general de toxinas se aplica a sustancias que pueden ser moléculas pequeñas (< 500 Da), péptidos, polipéptidos o proteínas (King *et al.*, 2008, 2015; Kalia *et al.*, 2015; Picones, 2015).

Desde hace mucho tiempo los venenos y sus componentes polipeptídicos han tomado importancia por su tamaño y estructura compacta. Por lo general estas estructuras se estabilizan por puentes ricos en disulfuro, lo cual les proporciona propiedades fisicoquímicas capacitándolos para resistir la degradación enzimática y la eliminación por diferentes tejidos. Cabe resaltar que se han reconocido como modificadores muy potentes de la función y altamente selectivos de los canales iónicos (Figura 5). Por lo anteriormente mencionado pueden usarse como

fármacos potenciales o como herramientas farmacológicas que ayuden a revelar estructuras y funciones biofísicas de canales iónicos a los que se unen o modifican (King *et al.*, 2008; Bagal *et al.*, 2013; King *et al.*, 2015; Picones, 2015).

En general, las toxinas tienen dos formas de actuar sobre los canales, la primera es bloqueando el poro, por lo cual se inhibe el flujo de iones al unirse a la parte externa o dentro del poro conductor. En la segunda opción, la toxina interactúa con una región del canal que altera la conformación funcional de este último, por ende, el mecanismo de activación se ve alterado (Kalia *et al.*, 2015).

3.4.1 Acción sobre CatSper

Históricamente las toxinas de escorpiones, arañas, anémonas, serpientes, ranas, peces globo e insectos se han utilizado para obtener información sobre la función, estructura y sensibilidad farmacológica sobre canales voltaje-dependientes y activados por ligando, incluyendo canales de potasio (Kv), sodio (Nav) y Ca^{2+} (Cav)(Kalia *et al.*, 2015).

King y colaboradores en el 2015 reportaron que los venenos de serpientes, arañas, caracoles cónicos y en general todos los reptiles venenosos tienen el potencial para bloquear canales de

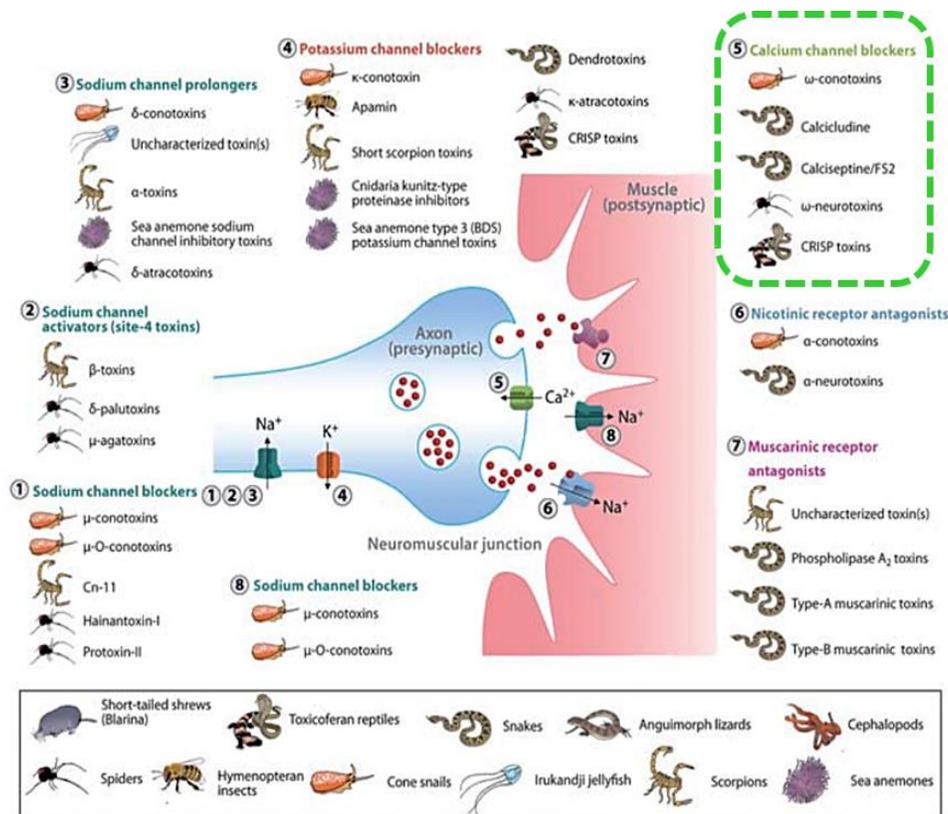


Figura 5. Blancos de toxinas de diferentes animales. En la figura se muestra la acción que tienen las toxinas de diferentes animales sobre los canales iónicos. Los venenos de los animales localizados en los números 1, 2, 3 y 8 actúan sobre canales de Sodio (Na^+), el número 4 son venenos de animales que tienen acción sobre canales de potasio (K^+), el número 5, donde se encuentra el recuadro verde, son venenos de animales que tienen acción sobre canales de Ca^{2+} , se encuentran marcados con un recuadro porque en este trabajo nos interesan los venenos capaces de bloquear canales de Ca^{2+} , el número 6 son venenos que actúan como antagonistas del receptor nicotínico y el número 7 son venenos que actúan como antagonistas del receptor muscarínico. Imagen tomada de King *et al.*, 2015.

Ca²⁺ (Figura 5) (King *et al.*, 2015). Por lo cual las toxinas biológicas procedentes de estos venenos podrían llegar a bloquear al canal CatSper.

3.5 Fluorescencia como herramienta para estudiar canales iónicos

La fluorescencia se produce cuando una sustancia se excita por radiación luminosa, donde algunos átomos y moléculas pueden absorber luz a una longitud de onda particular y después de un extremadamente breve intervalo emite fotones de mayor longitud de onda (Sampedro *et al.*, 1995; Davidson, 2015). La fluorescencia en muestras biológicas se produce por el marcado del espécimen con moléculas fluorescentes conocidos como “fluorocromos o fluoróforos”, con los cuales se realiza una tinción selectiva de los componentes de la célula (Sampedro *et al.*, 1995).

Una estrategia utilizada para estudiar los canales iónicos ha sido el utilizar fluorocromos que detecten selectivamente cambios en la concentración de un ion en particular. Actualmente existen moléculas fluorescentes capaces de detectar cambios en la [Ca²⁺]_i, en la concentración intracelular de sodio ([Na⁺]_i), en el potencial de hidrógeno (pH), en el V_m, entre otros (Darszon, 2007).

Usando estas moléculas fluorescentes se puede obtener información muy valiosa sobre flujos iónicos en poblaciones de espermatozoides, sin embargo, cuando se utilizan para medir intensidades de fluorescencia no se sabe con exactitud dónde ocurren los cambios iónicos dentro de la célula (Darszon, 2007).

3.5.1 Técnica de fluorimetría automatizada de alto rendimiento

El uso de tecnologías automatizadas con fluoróforos para el registro de la actividad de canales iónicos ha sido de suma importancia para encontrar fármacos capaces de modificar la actividad de estos canales iónicos. Los experimentos realizados en este trabajo fueron mediante ensayos de alto rendimiento o HTS por sus siglas en inglés (high-throughput screening), ya que esta técnica ofrece una alta producción de datos experimentales, sin menoscabo en sensibilidad, precisión, solidez y reproducibilidad de los resultados (Kalia *et al.*, 2015; Picones *et al.*, 2016).

Para estos ensayos se han desarrollado diversos equipos, entre ellos se encuentra el lector de microplacas de alto rendimiento automatizado, FlexStation3® (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Este equipo cuenta con un pipeteador de 8 o 16 canales que permite la adición de reactivos durante el experimento a microplacas de 96 o 384 pozos, además, contiene un sistema óptico doble, el cual puede operar por encima o por debajo de la microplaca. Este lector puede realizar mediciones ópticas de absorbancia, intensidad de fluorescencia, polarización de fluorescencia, luminiscencia y de fluorescencia a lo largo del tiempo.

3.6 Venenos de serpientes

Dentro de los animales vertebrados está el grupo de los reptiles, el cual incluye cuatro órdenes: Testudines (tortugas), Crocodylia (cocodrilos), Sphenodontia (tuátaras) y Squamata (lagartos, lagartijas y serpientes) (Reptiles | Biodiversidad Mexicana).

Dentro de las serpientes se encuentra la familia Elapidae (Tabla 1), la cual se alimenta de lagartijas y serpientes de menor tamaño. Los venenos de estas serpientes se encuentran compuestos

principalmente por neurotoxinas que ocasionan la parálisis de sus presas. Estos venenos pueden estar compuestos por α -neurotoxinas pertenecientes a una familia de proteínas sin actividad enzimática denominadas toxinas de tres dedos (3FTx), de las cuales, el 40% de todas las 3FTx secuenciadas se encuentran en esta familia (Kini & Doley, 2010; Neri *et al.*, 2014; Kalia *et al.*, 2015).

Las 3FTx son polipéptidos (60-74 residuos de aminoácidos) que muestran una gran variedad de efectos biológicos debido a que se pueden unir a diferentes receptores. Un efecto específico de las α -neurotoxinas es inhibir la contracción muscular, esto se debe a que estas toxinas se unen al receptor nicotínico de acetilcolina, impidiendo la unión del neurotransmisor, al impedir esta unión la membrana muscular no se despolariza y por ende no se da la contracción. Ejemplo de esto es la muerte por asfixia, que ocurre cuando la parálisis alcanza al diafragma y se detiene la respiración. Los síntomas pueden presentarse desde 20 minutos hasta 20 horas después de la mordedura (Kini & Doley, 2010; Neri *et al.*, 2014).

La composición y los mecanismos que ocasionan la variación en los venenos aún son poco comprendidos, es por ello que, aún, representan un campo de investigación muy grande y relevante para la medicina, biología, farmacología e inmunología, entre otros (Neri *et al.*, 2014).

Taxonomía

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Clase	Sauropsida
Orden	Squamata
Suborden	Serpentes
Familia	Elapidae

Tabla 1. Taxonomía correspondiente a la familia de serpientes Elapidae (Fernández Álamo & Rivas, 2007; Biodiversity explorer)

4 Justificación

Los canales iónicos son elementos clave durante la señalización celular. En los espermatozoides se ha demostrado que existen dos canales iónicos imprescindibles para que ocurra la fecundación, el permeable a calcio CatSper y el permeable a potasio KSper; ambos canales se expresan de manera exclusiva en el espermatozoide (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Lishko, 2016).

Este trabajo de tesis se centra justamente en la identificación de una posible toxina de naturaleza polipeptídica, capaz de inhibir la actividad del canal CatSper, exclusivo del espermatozoide humano.

La identificación de un agente farmacológico con las características mencionadas anteriormente podría sentar las bases para el potencial desarrollo de un principio activo para un anticonceptivo masculino no hormonal y reversible.

5 Hipótesis

Dada la alta potencia y selectividad farmacológica de fracciones polipeptídicas procedentes del veneno de serpientes sobre canales iónicos, es posible identificar alguna(s) de ellas capaz(es) de actuar como bloqueadores del canal iónico de calcio CatSper, específico del espermatozoide humano.

6 Objetivos

6.1 General

Identificar inhibidores del canal de Ca^{2+} CatSper, utilizando fracciones polipeptídicas provenientes de venenos de serpientes de la familia Elapidae analizando la respuesta a progesterona (PG) mediante la técnica de fluorimetría automatizada de alto rendimiento en poblaciones de espermatozoides humanos.

6.2 Particulares

- Realizar un tamizaje de fracciones polipeptídicas (FPs) de venenos de 14 especies de elápidos, midiendo cualitativamente los cambios en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducidos por PG y prosiguiendo el análisis solamente con aquellas fracciones que disminuyen la respuesta a PG (“HITS”).
- Evaluar el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal inducido por la sola incubación con las fracciones denominadas “HITS”.
- Determinar la dependencia con la concentración de los “HITS” sobre los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por PG.

7 Materiales y métodos

7.1 Reactivos

- **Solución Poly-L-lysina:** Polímero de aminoácidos cargados positivamente utilizado para promover la adhesión de los espermatozoides a las microplacas (Sigma-Aldrich). Utilizada al 0.01% para los experimentos.
- **Fluo4-AM (C₅₁H₅₀F₂N₂O₂₃):** Molécula fluorescente permeable a las células, sensible a los cambios de la [Ca²⁺]_i (Figura 6), su pico máximo de excitación se da a los 495nm y el de emisión a los 516 nm (Invitrogen, 2011) (Thermo Fisher Scientific). Concentración utilizada para los experimentos [4 μM].
- **Progesterona (PG, C₂₁H₃₀O₂):** Hormona esteroidea femenina producida y liberada por los ovarios, específicamente por los cuerpos lúteos y las células del cúmulus que rodean al ovocito (Figura 7) (Sigma-Aldrich). Concentración utilizada para los experimentos [5 μM].
- **Ionomicina (C₄₁H₇₀O₉Ca):** Antibiótico para bacterias Gram-positivas producido por *Streptomyces conglobatus* (Figura 8), en células de mamíferos actúa como un potente ionóforo de Ca²⁺, el cual induce un influjo máximo de este ion a través de la membrana plasmática (Alomone labs). Concentración utilizada para los experimentos [10 μM].
- **Mibefradil (Mb, C₂₉H₃₈FN₃O₃ · 2HCl · xH₂O):** Compuesto que bloquea canales de Ca²⁺ tipo T y al canal CatSper (Figura 9). Bloqueador utilizado como control positivo (Sigma-Aldrich). Concentración utilizada para los experimentos [40 μM].

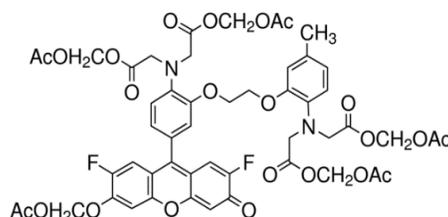


Figura 6. Estructura química del Fluo4-AM. Imagen tomada de <http://www.sigmaaldrich.com>

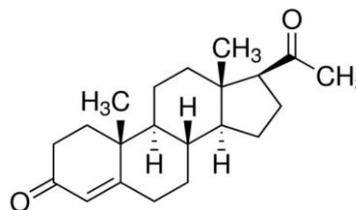


Figura 7. Estructura química de la progesterona. Imagen tomada de <http://www.sigmaaldrich.com>

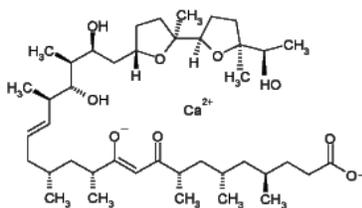


Figura 8. Estructura química de la ionomicina. Imagen tomada de <http://www.alomone.com>

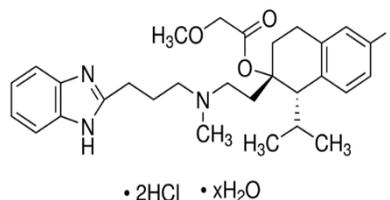


Figura 9. Estructura química del mibefradil. Imagen tomada de <http://www.sigmaaldrich.com>

7.2 Obtención de las muestras de semen

Los espermatozoides humanos se obtuvieron por masturbación de donadores sanos (de 18-30 años) con al menos 48 horas de abstinencia sexual y cumpliendo con los parámetros de normalidad de una muestra de semen establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS): volumen ≥ 1.5 ml, pH ≥ 7.2 , concentración espermática ≥ 15 millones de células por ml, número total de espermatozoides ≥ 39 millones de células por eyaculado, movilidad total (progresivos y no progresivos) $\geq 40\%$, movilidad progresiva $\geq 32\%$ y con una viabilidad $\geq 58\%$ (WHO, 2010; Sarabia & Munuce, 2011).

Aparte de los parámetros anteriormente mencionados, se establecieron dos requerimientos adicionales: 1) concentración espermática ≥ 30 millones de células por ml y 2) que dichas células mostraran un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ al estimular con PG.

7.3 Obtención de espermatozoides móviles

Las muestras de semen se colocaron en una incubadora durante 30 min a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂, en este tiempo se llevó a cabo el proceso de licuefacción (la muestra pasa de una consistencia viscosa a líquida gracias a la acción de la proteína fibrinolisisina presente en el líquido eyaculator) lo que permite la adecuada movilidad de los espermatozoides (Álvarez Montoya et al., 2006).

La selección de los espermatozoides viables se hizo a través de la técnica de “swim-up”. Esta técnica consistió en colocar 600 μ l de semen previamente licuado en el fondo de los tubos de ensayo, los tubos se colocaron en una gradilla con una inclinación de 45° y se adicionó gota por gota 1 ml de medio Ham's F-10 (Sigma-Aldrich) no capacitante, el cual contenía: piruvato de sodio 0.11 g/l, rojo fenol 0.0013 g/l, HEPES 20 mM y 2 mM de cloruro de Ca²⁺ (CaCl₂). Posteriormente, los tubos se colocaron en una incubadora durante una hora en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Transcurrido dicho tiempo de incubación se recuperó el sobrenadante de cada tubo (el cual contenía los espermatozoides móviles) y se realizó el conteo de células por ml con la ayuda de la cámara Makler (de New York Microscope Company Inc). Dependiendo de cada donador el número de células variaba, sin embargo, siempre se ajustó a una concentración de 30 millones de células por ml.

7.4 Incubación de células con el fluoróforo

Los espermatozoides recuperados en el sobrenadante (móviles y viables) se incubaron 45 minutos con Fluo4-AM [4 μ M] (Thermo Fisher Scientific). Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las células a 600 g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 820 μ l de medio de registro humano (MRH) el cual contenía (en mM): 5 D-Glucosa, 20 HEPES, 4 KCl, 10 Lactato de Sodio, 1 MgCl₂, 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 1 Piruvato de Sodio y 2 CaCl₂, el pH se ajustó a 7.4 con NaOH. Este medio se usó para mantener a las células en condiciones lo más parecidas a las fisiológicas durante el experimento.

7.5 Medición de la intensidad de fluorescencia usando el equipo FlexStation3®

Los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides humanos se midieron con ayuda del Lector de microplacas de alto rendimiento automatizado, FlexStation3® (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA).

Los espermatozoides se sembraron en microplacas BRAND transparentes de 96 pozos de fondo plano (tratadas previamente con poli-L-lisina 0.01%) a una densidad de $\sim 3 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$. La programación del equipo y la adquisición de datos se realizó con el software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA).

El fluoróforo se excitó a los 488 nm y la emisión se midió a 525 nm. El instrumento realizó mediciones de la intensidad de fluorescencia del fondo de la microplaca cada 2 segundos por al menos 370 segundos.

7.6 Aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG en presencia o ausencia de fracciones polipeptídicas (FPs)

El protocolo general de estimulación con PG para inducir un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ consistió en medir la fluorescencia basal durante 30 segundos, posteriormente el equipo efectuó la adición de PG $[5 \mu\text{M}]$ y monitoreó los cambios en la intensidad de fluorescencia durante 220 segundos, finalmente a los 250 segundos adicionó ionomicina $[10 \mu\text{M}]$ registrando la fluorescencia durante 120 segundos más (Figura 10). El efecto de las FPs se evaluó pre-incubando estas fracciones a una $[6.7 \mu\text{g/ml}]$ durante 5 minutos previos al registro en el equipo automatizado. Cada condición se evaluó con 2-4 donadores diferentes por duplicado.

En experimentos con esta condición de estimulación con PG solamente se analizó la respuesta transitoria, midiendo el valor máximo (pico) de la respuesta a PG (ejemplificado a la derecha, en la parte superior de la Figura 10).

Una vez identificadas las FPs que produjeron una disminución en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG (“HITS”), se realizó la dependencia con la concentración de las mismas FPs utilizando el mismo protocolo, es decir, las llamadas relaciones o curvas Dosis-Efecto. Las dosis evaluadas fueron:

- $[67 \mu\text{g/ml}]$
- $[6.7 \mu\text{g/ml}]$
- $[0.67 \mu\text{g/ml}]$
- $[0.067 \mu\text{g/ml}]$
- $[0.006 \mu\text{g/ml}]$

7.7 Cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs.

El registro del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs consistió en medir la fluorescencia basal durante 30 segundos, posteriormente el aparato efectuó la adición de las FPs deseadas $[6.7 \mu\text{g/ml}]$ y se midieron los cambios durante 300 segundos en la intensidad de fluorescencia ocasionados por la sola incubación de la FP y finalmente a los 330 segundos el

multilector adicionó ionomicina [10 μM] registrando la fluorescencia durante 120 segundos más. Cada condición se evaluó con 2-4 donadores diferentes por duplicado (Figura 10).

Dicho protocolo sólo se llevó a cabo con las FPs que ejercieron una disminución en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la estimulación con PG, a las que llamamos “HITS”. Del mismo modo solo se evaluó el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones en los HITS que mostraron una dependencia con la concentración.

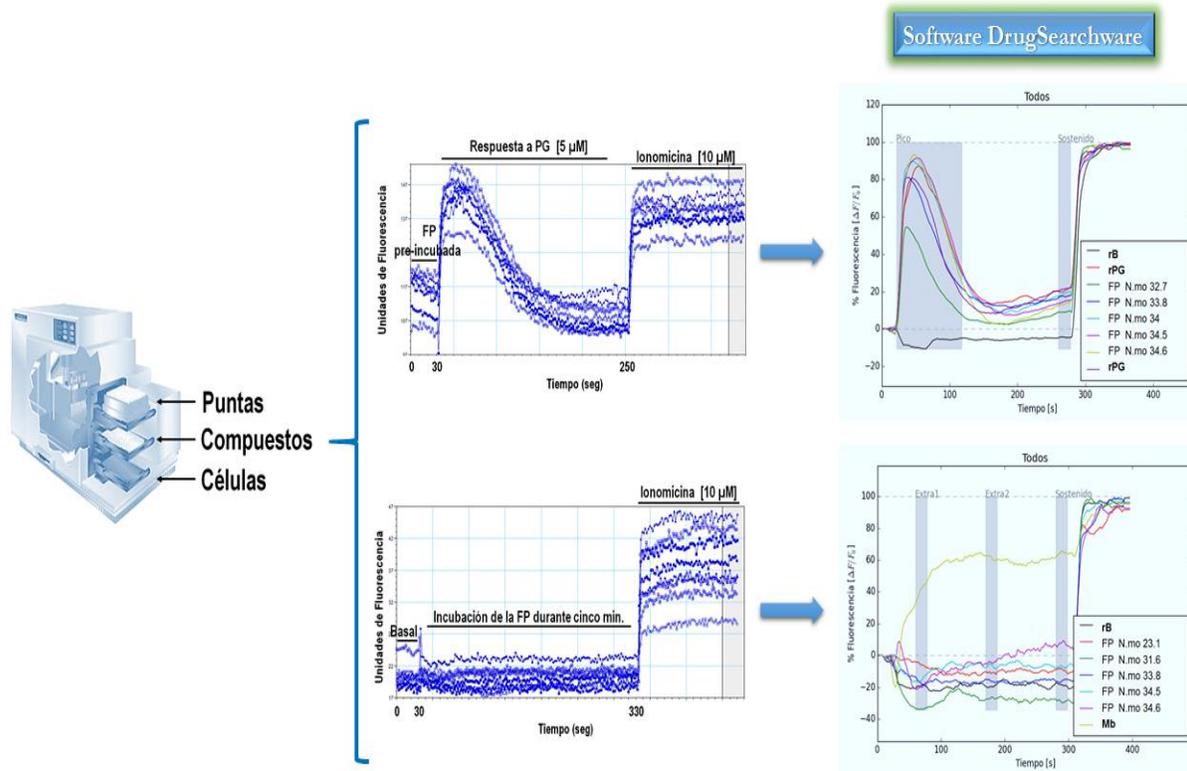


Figura 10. Medición de la intensidad de fluorescencia usando el equipo FlexStation3® y normalización de los datos. A la izquierda se muestra el equipo FlexStation3®. En la parte central se muestran las cinéticas que arroja el software del equipo, la gráfica superior corresponde a la medición del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la PG en presencia o ausencia de las FPs, la gráfica inferior corresponde al registro del cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs. Posteriormente los datos se normalizaron con el software DrugSearchware (la amplitud de la fluorescencia (ΔF) se normalizó respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$), el cual nos resume la información en las gráficas mostradas a la derecha. Este software analiza la respuesta transitoria (pico) y sostenida inducida por PG, también mide los cambios de fluorescencia inducidos por la sola incubación de la FP durante 20 segundos a diferentes tiempos (extra 1 indica los cambios de fluorescencia a los 60 segundos de incubación, extra dos indica los cambios a los 180 segundos de incubación y sostenido indica los cambios a los 300 segundos de incubación de la FP analizada).

7.8 Controles internos

- **Respuesta basal (rB):** A lo largo de este experimento únicamente se adicionó MRH en lugar de aplicar una FP o PG, para demostrar que las células no sufrían cambios en la intensidad de fluorescencia con el medio fisiológico (MRH).
- **Respuesta a progesterona (rPG):** Respuesta de los espermatozoides a la estimulación con PG en ausencia de alguna FP o compuesto. El promedio del valor máximo (pico)

de la intensidad de fluorescencia de dicho control se utilizó como la máxima respuesta a la progesterona que se obtiene en condiciones fisiológicas.

- **Respuesta a PG en presencia de bloqueador (rPG/Mb):** Respuesta a la PG donde los espermatozoides se pre-incubaron con un agente bloqueante del canal CatSper y de canales de Ca^{2+} (Mibefradil 40 μM), bajo estas condiciones se observó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la PG del 40% aproximadamente. Cabe aclarar que durante el tiempo de incubación el Mb por si solo aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por lo cual se registró la fluorescencia durante 30 segundos después del tiempo de incubación y posteriormente se adicionó la PG, el registro correspondiente a estos 30 segundos se normalizó a 0 unidades de fluorescencia y a partir de este 0, se midió cuánto aumentó la fluorescencia en respuesta a la PG.
- **Respuesta al bloqueador Mibefradil (Mb):** Respuesta de los espermatozoides al adicionar el agente Mibefradil [40 μM], bajo esta condición se observó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del 20-35% aproximadamente.

7.9 Compuestos a ensayar

Las 245 fracciones polipeptídicas utilizadas en este trabajo se obtuvieron de una biblioteca desarrollada por el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa) en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Dicha biblioteca constaba de aproximadamente 900 fracciones, pertenecientes a diferentes venenos de animales ponzoñosos (tarántulas, alacranes y serpientes). Estas FP se aislaron por el Biol. Héctor Cardoso Torres, mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés). Los venenos se proporcionaron por los Doctores Lourival Possani, Alejandro Alagón y Gerardo Corzo, del IBT.

Las FP se almacenaron en stocks a una concentración 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en MRH. Partiendo de este stock se prepararon diferentes concentraciones dependiendo del experimento. La dosis manejada para evaluar por primera vez las FPs fue [6.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$] y las dosis que se manejaron para evaluar la dependencia con la concentración o las llamadas curvas Dosis-Efecto fueron:

- [67 $\mu\text{g}/\text{ml}$]
- [6.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$]
- [0.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$]
- [0.067 $\mu\text{g}/\text{ml}$]
- [0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$]

7.10 Análisis de datos

Los resultados de los experimentos se obtuvieron a través del software SoftMax®Pro del equipo FlexStation3® y se exportaron en formato de archivos de texto sin formato (*.txt). Estos archivos se importaron al programa DrugSearchware (Pérez-Ortega & Picones, 2016) desarrollado por el Laboratorio Nacional de Canalopatías, donde se realizó la normalización de los datos obtenidos anteriormente (Figura 10).

La normalización se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Resp. Normalizada} = \frac{(F + F_{min})}{F_{max} - F_{min}}$$

Donde:

F = Valor máximo de la respuesta transitoria a PG sola, FP sola o respuesta en presencia de ambos

F_{min} = Fluorescencia basal de cada experimento partiendo de cero unidades de fluorescencia ($\Delta F/F_0-1$)

F_{max} = Máxima intensidad de fluorescencia (100%) producido por la adición de ionomicina. Todos los valores reportados en porcentaje son respecto a este valor.

El programa arroja un documento Excel del paquete Office (Microsoft) donde nos da los valores indicados anteriormente de cada pozo analizado y el promedio de aquellos registros correspondientes a condiciones experimentales iguales (repeticiones).

Adicionalmente se elaboró una base de datos en Excel, la cual contenía los registros de las 245 FPs analizadas y todos los registros de los controles utilizados por experimento.

Los resultados obtenidos al finalizar el análisis de datos son el promedio \pm su error estándar de 2-4 donadores diferentes por cada compuesto.

7.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6 aplicando un ANOVA de una vía con un test post hoc de Dunnett, donde se comparó la respuesta de los espermatozoides a la PG en ausencia de algún compuesto (rPG) contra la respuesta a la PG de cada FP preincubada [6.7 $\mu\text{g/ml}$]. Para analizar la dependencia con la concentración de los HITS encontrados se volvió a aplicar un ANOVA de una vía, pero ahora realizando un test post hoc de Tukey. Se consideró como resultado estadísticamente significativo $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***). Las gráficas se produjeron con el programa Sigma Plot 13.0.

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico de los controles (ver [APÉNDICE 1: Análisis estadístico de controles](#)).

8 Resultados

Los experimentos se realizaron con espermatozoides no capacitados, puesto que la Dra. Loza en el LaNCa (resultados no publicados) realizó experimentos con la misma estrategia experimental usada en esta tesis, donde comparó la señal de calcio inducida por PG de espermatozoides capacitados y no capacitados. Ella encontró que al realizar los experimentos con este sistema utilizando el multilector de microplacas no existen diferencias significativas entre espermatozoides capacitados y no capacitados, por lo cual para realizar un estudio más rápido y práctico se decidió utilizar espermatozoides no capacitados.

De la misma manera, los espermatozoides no soportaban encontrarse mucho tiempo pegados al fondo de la placa, puesto que perdían su viabilidad o morían, por tal motivo todos los experimentos se dividieron en dos partes y el equipo solamente evaluaba dos columnas a la vez. Estas medidas se tomaron para evitar que cada experimento durara más de 13 minutos y se evaluara la misma FP con el mismo donador por duplicado.

Una vez bien estandarizados los protocolos se procedió a medir de manera directa la acción del canal CatSper, midiendo los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por PG en presencia de las FPs. Al realizar este procedimiento se observó claramente una cinética bifásica de la $[Ca^{2+}]_i$ producida en respuesta a la PG (Strünker *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012). En este trabajo solamente se evaluó la respuesta transitoria, la cual le denominamos pico máximo de la respuesta a PG (control **rPG** = $89.71 \pm 1.4\%$ de fluorescencia con respecto al 100% establecido con ionomicina). El valor presentado en los resultados corresponde al promedio de este pico, el cual es la máxima respuesta a PG que se produce en una población de espermatozoides en presencia de cierta FP.

En total se analizaron 245 FPs pertenecientes a venenos de serpientes de la familia Elapidae, las cuales se obtuvieron a partir de dos procesos de fraccionamiento por RP-HPLC de los venenos. Del primer fraccionamiento se obtuvieron 200 FPs pertenecientes a venenos de 14 especies de cuatro géneros diferentes, mientras que en el segundo se obtuvieron otras 45 FPs (distintas a las 200 FPs anteriores) de cinco elápidos ya analizados anteriormente, mediante el primer fraccionamiento (véase [Tabla 2](#)).

Puesto que los fraccionamientos de las FPs se realizaron en diferentes épocas se evaluaron en dos tamizajes diferentes. Cada fracción se evaluó por duplicado con al menos tres donadores diferentes (excepto aquellas fracciones cuya cantidad era insuficiente), teniendo un total de seis resultados para cada FP. El análisis estadístico y experimental solamente se siguió con aquellos resultados que provenían de al menos 3 donadores diferentes.

Los controles representados en las siguientes gráficas corresponden al promedio de cada uno \pm su error estándar: **rB**, **rPG**, **rPG/Mb** y **Mb**. Debido a que esto es un ensayo de alto rendimiento, al aplicar la estadística se tomaron todos los datos de la muestra que estuvieron dentro del intervalo de confianza del 95% para el análisis estadístico (ver [APÉNDICE 1: Análisis estadístico de controles](#)). Posteriormente se realizó un análisis estadístico aplicando un ANOVA de una vía con un test post hoc de Dunnett, el cual compara el control **rPG** contra cada fracción.

Tabla 2. Lista de serpientes utilizadas para realizar los tamizajes de FPs.

Familia	Género	Especie (spp)	FPs por spp 1° tamizaje	FPs por spp 2° tamizaje	
Elapidae	<i>Ophiophagus</i>	<i>hannah</i>	13		
	<i>Walterinnesia</i>	<i>aegyptia</i>	13		
	<i>Bungarus</i>	<i>multicinctus</i>	20		
	<i>Naja</i>		<i>haje</i>	11	
			<i>annulifera</i>	11	
			<i>siamensis</i>	17	10
			<i>nivea</i>	12	
			<i>kaouthia</i>	14	6
			<i>pallida</i>	11	
			<i>nigricollis</i>	10	
			<i>melanoleuca</i>	19	12
			<i>oxiana</i>	16	
			<i>nubiae</i>	14	9
		<i>mossambica</i>	19	8	
Total	4	14	200	45	

8.1 Primer tamizaje: Medición del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG

Como se observa en la figura 11, del primer tamizaje de las FPs a una concentración de $[6.7 \mu\text{g/ml}]$, tan solo 1.5% de los compuestos (3/200 FPs) provocaron una disminución estadísticamente significativa de la respuesta a PG (disminución en la fluorescencia de calcio intracelular), estas FPs se denominaron “HITS”, barras amarillas; mientras que 19% (38/200 FPs) mostraron una potencialización de dicha respuesta (aumento de la fluorescencia) estadísticamente significativa, barras rosas (Figura 11). Para un mejor análisis y entendimiento de los resultados de este primer tamizaje se describirán los resultados por especie.

8.1.1 *Ophiophagus Hannah*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 13 FPs, de las cuales el 43% (6/13) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **25.8a** ($39 \pm 9.3\%$; $p < 0.01$), **25.8b** ($30 \pm 3.2\%$; $p < 0.05$), **28.4** ($48 \pm 9.6\%$; $p < 0.001$), **29.4** ($36 \pm 9.6\%$; $p < 0.01$), **30.6** ($31 \pm 8.1\%$; $p < 0.05$) y **32.6** ($57 \pm 18.6\%$; $p < 0.001$) (Figura 12). A pesar de ello, todas las FPs de esta especie, excepto la 31.4, mostraron una tendencia a potencializar la respuesta a la PG, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo. Algunas FPs no cuentan con una barra de error estándar debido a que el experimento se realizó con menos de tres donadores, esto se debió a que la cantidad de dicha fracción era insuficiente.

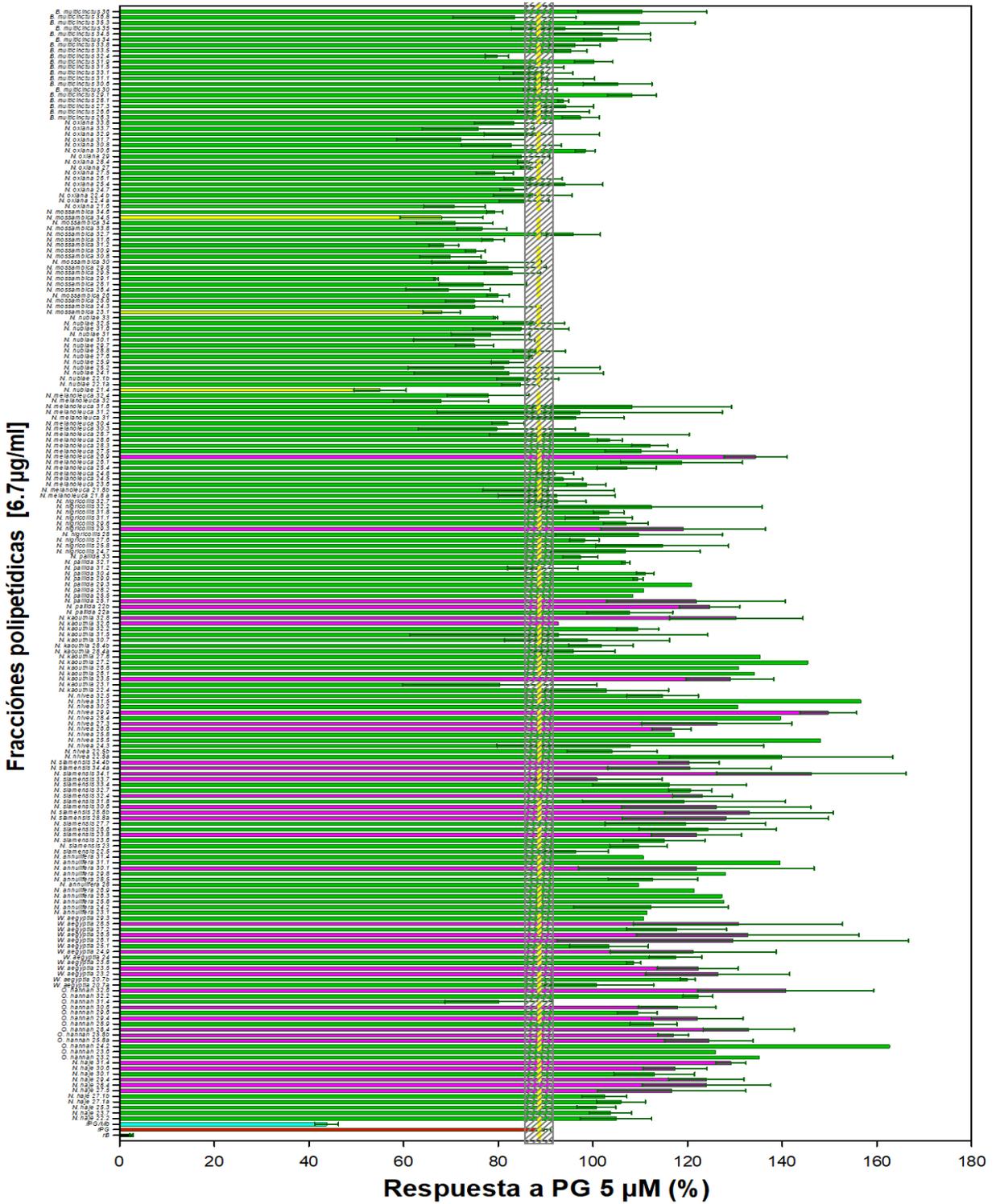


Figura 11. Primer tamizaje. Efecto de diferentes FPs sobre las respuestas a la PG en espermatozoides humanos. Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 μM] se incubaron con las diferentes FPs [6.7 μg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la [Ca²⁺]; en respuesta a la PG. La barra en color negro representa al control **rB**, la de color rojo al **rPG** y la azul **rPG/Mb**. La línea amarilla indica el promedio de la rPG y el recuadro gris su error estándar. Las barras amarillas representan a las FPs (*N. mossambica* 23.1, 34.5 y *N. nubiae* 21.4) que produjeron una disminución estadísticamente significativa de dicha respuesta "HITS". Por el contrario, las barras de color rosa corresponden a las FPs que potencializaron la entrada de Ca²⁺ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio ± error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia (F_{max} =100%). n = 2-4 donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores p < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

La FP 31.4 fue la única que mostró una disminución del $11 \pm 11.33\%$ del aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. A pesar de que este decremento no fue estadísticamente significativo se analizó la relación Dosis-Efecto de la fracción, encontrando así que no hay una dependencia con la dosis, al no encontrar dicha dependencia se decidió no mostrar los resultados gráficamente.

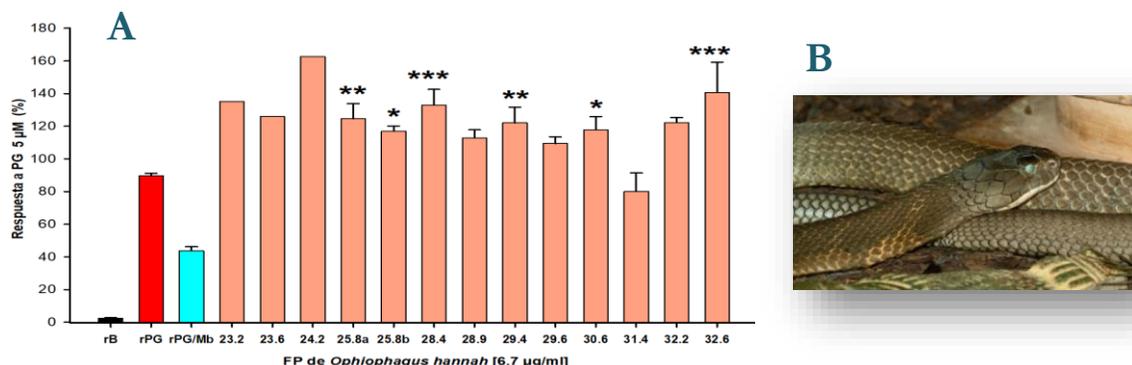


Figura 12. FPs del veneno de *O.hannah* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu M$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu g/ml$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores $p < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. **B)** Imagen de la serpiente *O. Hannah*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.2 *Walterinesia aegyptia*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 13 FPs, de las cuales el 43% (6/13) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: 23.2 ($41 \pm 15.2\%$; $p<0.05$), 23.5 ($36 \pm 8.5\%$; $p<0.05$), 24.9 ($35 \pm 17.5\%$; $p<0.05$), 26.1 ($44 \pm 37.1\%$; $p<0.01$), 26.5 ($48 \pm 23.4\%$; $p<0.01$) y 28.5 ($46 \pm 22.1\%$; $p<0.01$) (Figura 13). A pesar de que todas las FPs de esta especie mostraron una tendencia a potencializar la entrada de calcio a las células, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de las FPs mencionadas anteriormente.

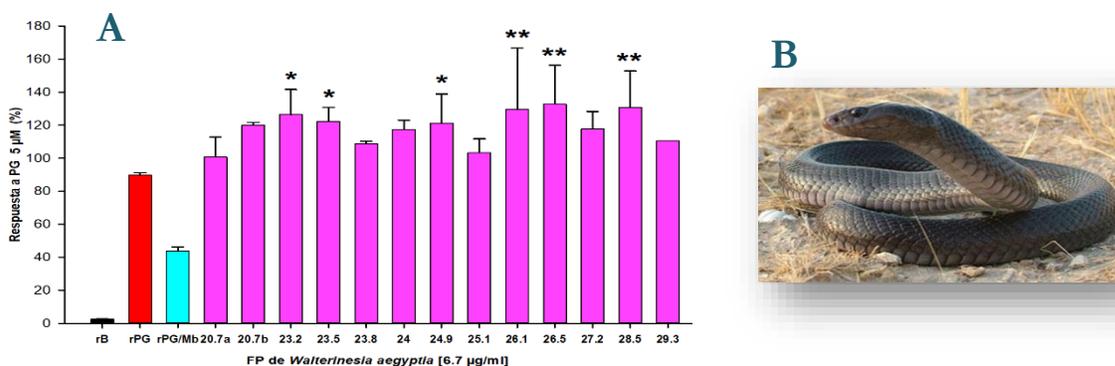


Figura 13. FPs del veneno de *W. aegyptia* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu M$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu g/ml$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. * y ** para valores $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente. **B)** Imagen de la serpiente *W. aegyptia*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.3 *Bungarus multicinctus*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 20 FPs, sin embargo, ninguna tuvo un efecto estadísticamente significativo, ya que la variación en la fluorescencia no fue muy diferente a la obtenida con el control rPG (Figura 14).

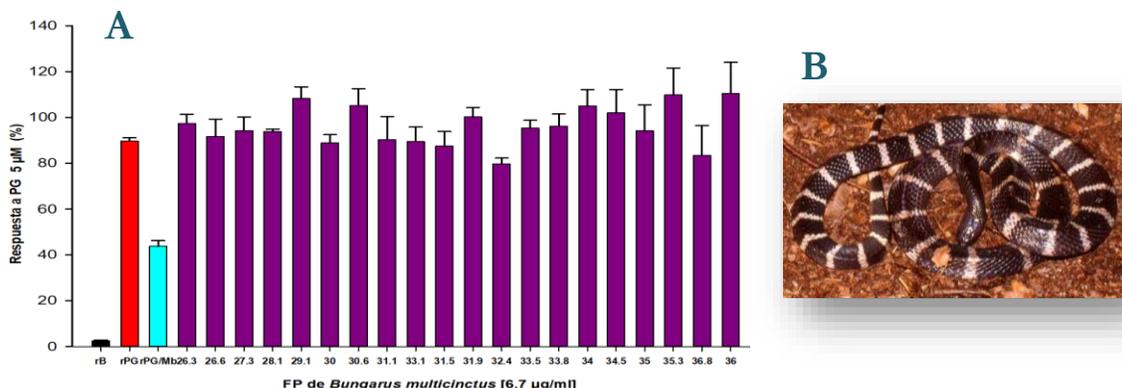


Figura 14. FPs del veneno de *B. multicinctus* no afectan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. A) Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], se incubaron con las diferentes FPs [6.7 µg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. B) Imagen de la serpiente *B. multicinctus*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.4 *Naja haje*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 11 FPs, de las cuales el 45% (5/11) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **27.5** ($30 \pm 15.6\%$; $p<0.05$), **28.4** ($38 \pm 13.5\%$; $p<0.01$), **29.4** ($38 \pm 7.97\%$; $p<0.05$), **30.6** ($31 \pm 6.8\%$; $p<0.05$) y **31.4** ($44 \pm 3.2\%$; $p<0.01$) (Figura 15). A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una tendencia a potencializar la respuesta a la PG, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de las FPs mencionadas anteriormente.

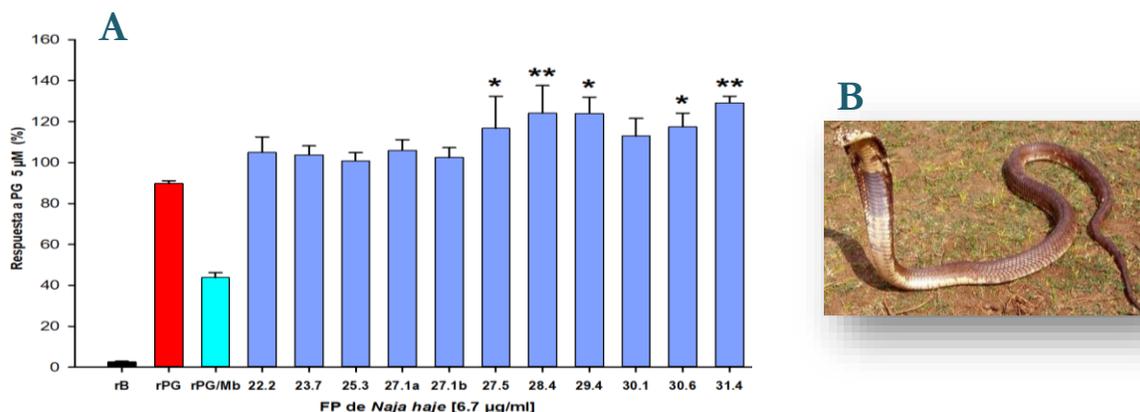


Figura 15. FPs del veneno de *Naja haje* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. A) Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], se incubaron con las diferentes FPs [6.7 µg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. * y ** para valores $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente. B) Imagen de la serpiente *N. haje*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.5 *Naja annulifera*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 11 FPs, de las cuales el 9% (1/11) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Esta fracción potenciadora fue: **30.1** ($36 \pm 24.9\%$; $p < 0.05$) (Figura 16). A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una tendencia a potencializar la respuesta a la PG, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de las FP mencionada anteriormente. Algunas FPs no cuentan con una barra de error estándar debido a que el experimento se realizó con menos de tres donadores, esto se debió a que la cantidad de dicha fracción era insuficiente.

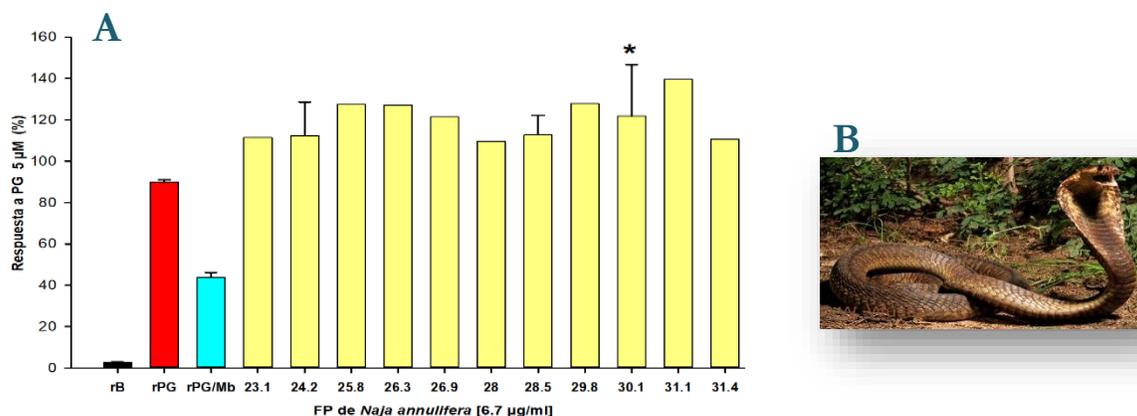


Figura 16. FPs del veneno de *Naja annulifera* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], se incubaron con las diferentes FPs [6.7 µg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. * para valor $p < 0.05$. **B)** Imagen de la serpiente *N. annulifera*, tomada de <http://calphotos.berkeley.edu>.

8.1.6 *Naja siamensis*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 17 FPs, de las cuales el 53% (9/17) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **23.8** ($37 \pm 5.5\%$; $p < 0.05$), **28.8a** ($47 \pm 13.1\%$; $p < 0.01$), **28.8b** ($40 \pm$

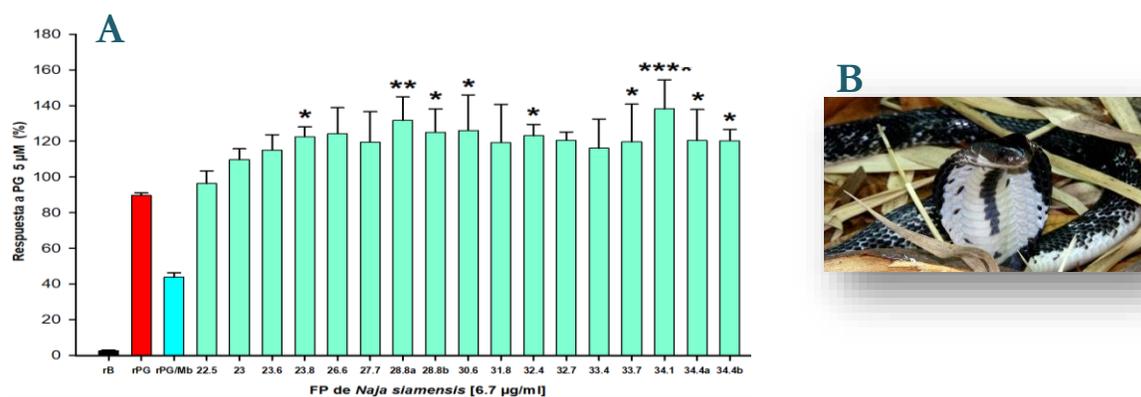


Figura 17. FPs del veneno de *Naja siamensis* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], se incubaron con las diferentes FPs [6.7 µg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. **B)** Imagen de la serpiente *N. siamensis*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

13.0%; $p < 0.05$), **30.6** ($41 \pm 19.9\%$; $p < 0.05$), **32.4** ($37 \pm 6.2\%$; $p < 0.05$), **33.7** ($33 \pm 21.2\%$; $p < 0.05$), **34.1** ($54 \pm 16.2\%$; $p < 0.001$), **34.4a** ($34 \pm 17.3\%$; $p < 0.05$) y **34.4b** ($34 \pm 6.3\%$; $p < 0.05$) (Figura 17). A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una tendencia a potencializar la respuesta a la PG, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de las FPs mencionadas anteriormente.

8.1.7 *Naja nivea*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 12 FPs, de las cuales el 33% (4/12) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **22.5a** ($56 \pm 23.6\%$; $p < 0.001$), **26.6** ($30 \pm 4.1\%$; $p < 0.05$), **27.3** ($41 \pm 15.8\%$; $p < 0.01$) y **29.9** ($67 \pm 5.9\%$; $p < 0.001$) (Figura 18). A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una tendencia a potencializar la respuesta a la PG, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de las FPs mencionadas anteriormente. Algunas FPs no cuentan con una barra de error estándar debido a que el experimento se realizó con menos de tres donadores, esto se debió a que la cantidad de dicha fracción era insuficiente.

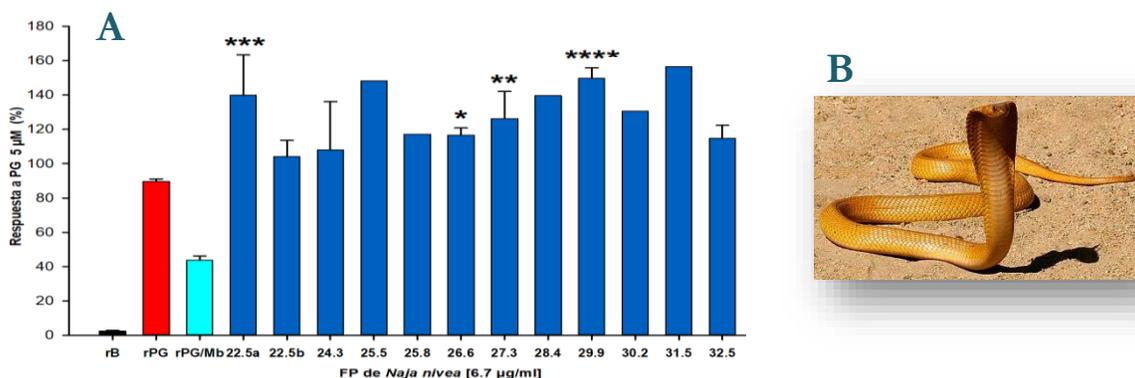


Figura 18. FPs del veneno de *Naja nivea* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. A) Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu M$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu g/ml$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores $p < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. B) Imagen de la serpiente *N. nivea*, tomada de <http://www.biodiversityexplorer.org>.

8.1.8 *Naja kaouthia*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 14 FPs, de las cuales el 21% (3/14) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **23.5** ($44 \pm 9.2\%$; $p < 0.001$), **32.6** ($55 \pm 40.0\%$; $p < 0.01$) y **32.8** ($45 \pm 14.1\%$; $p < 0.05$) (Figura 19). Algunas FPs no cuentan con una barra de error estándar debido a que el experimento se realizó con menos de tres donadores, esto se debió a que la cantidad de dicha fracción era insuficiente. En el caso de esta especie no se observó alguna tendencia de las FPs a potencializar o disminuir la respuesta a la PG.

Con respecto a la FP **23.1** fue la única que mostró una disminución del $10 \pm 20.5\%$ del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. A pesar de que este decremento no fue estadísticamente significativo se analizó la relación Dosis-Efecto de la fracción, encontrando así que no existe una

dependencia con la concentración, al no encontrar dicha dependencia se decidió no mostrar los resultados gráficamente.

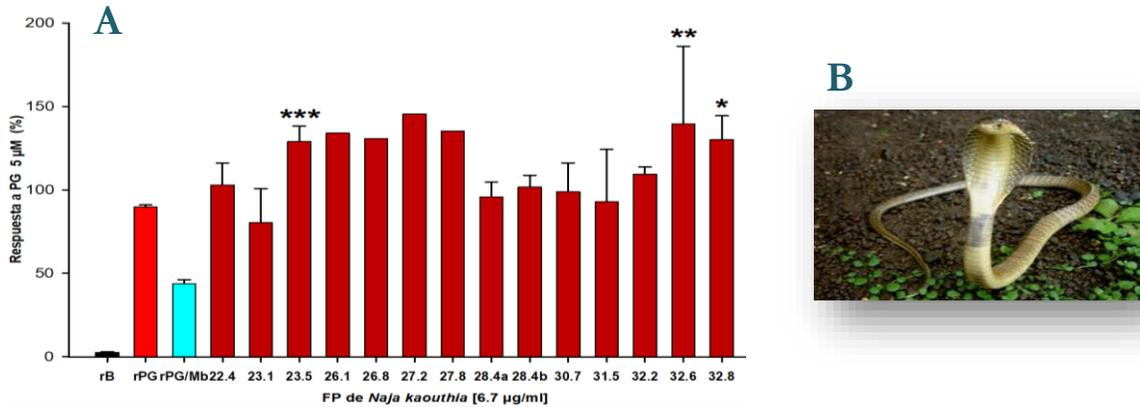


Figura 19. FPs del veneno de *Naja kaouthia* afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 $[4 \mu M]$, se incubaron con las diferentes FPs $[6.7 \mu g/ml]$ durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores $p < 0.05, 0.01$ y 0.001 , respectivamente. **B)** Imagen de la serpiente *N. kaouthia*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.9 *Naja pallida*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 11 FPs, de las cuales el 18% (2/11) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones potenciadoras fueron: **22b** ($40 \pm 6.3\%$; $p < 0.01$) y **25.1** ($36 \pm 18.8\%$; $p < 0.05$) (Figura 20). Algunas FPs no cuentan con una barra de error estándar debido a que el experimento se realizó con menos de tres donadores, esto se debió a que la cantidad de dicha fracción era insuficiente. En el caso de esta especie, fuera de las FPs mencionadas anteriormente, la variación en la fluorescencia no fue muy diferente a la obtenida con el control rPG.

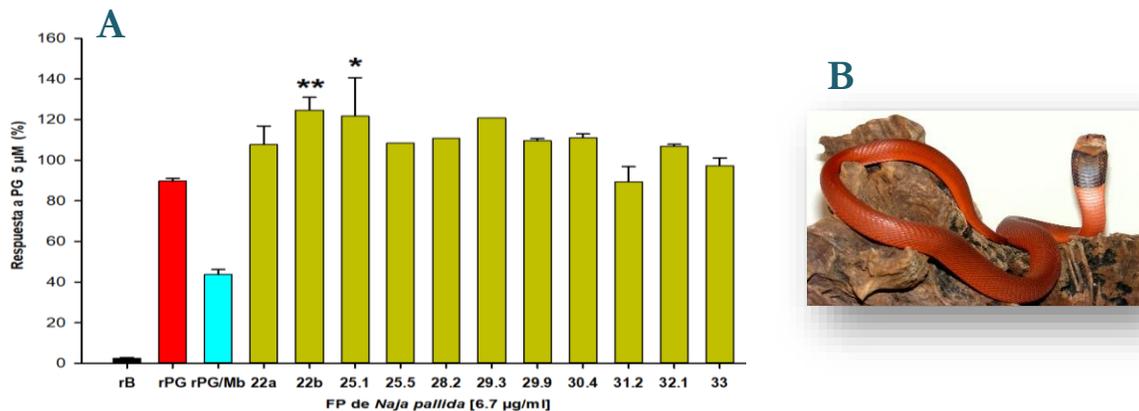


Figura 20. FPs del veneno de *Naja pallida* afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 $[4 \mu M]$, se incubaron con las diferentes FPs $[6.7 \mu g/ml]$ durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. *, ** y *** para valores $p < 0.05, 0.01$ y 0.001 , respectivamente. **B)** Imagen de la serpiente *N. pallida*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.10 *Naja nigricollis*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 10 FPs, de las cuales el 10% (1/10) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Esta fracción potenciadora fue: **29.3** ($33 \pm 17.3\%$; $p < 0.05$) (Figura 21). A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una ligera tendencia a potencializar la respuesta a la PG, este aumento no fue estadísticamente significativo, con excepción de la FP mencionada anteriormente.

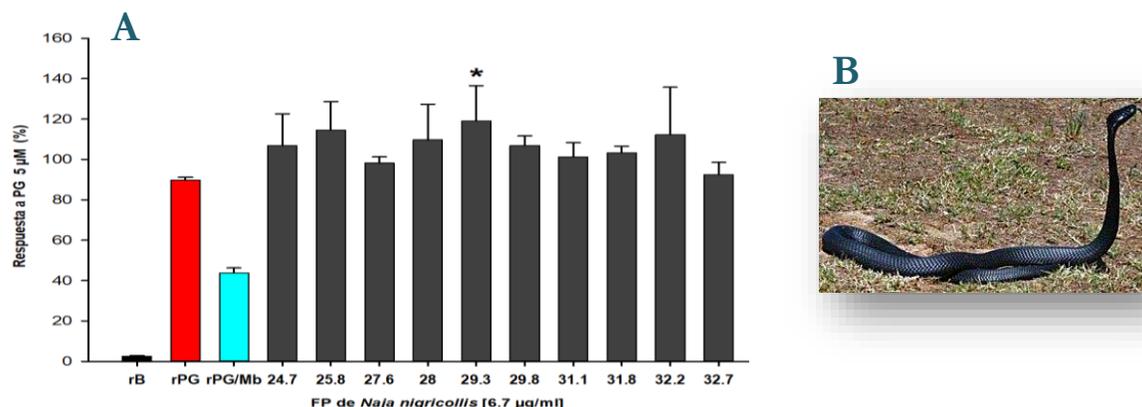


Figura 21. FPs del veneno de *Naja nigricollis* potencializan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. A) Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu M$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu g/ml$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. * para valor $p < 0.05$. B) Imagen de la serpiente *N. nigricollis*, tomada de <http://www.biodiversityexplorer.org>.

8.1.11 *Naja melanoleuca*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 19 FPs, de las cuales el 5% (1/19) mostraron una potencialización estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Esta fracción potenciadora fue: **26.9** ($50 \pm 6.7\%$; $p < 0.001$) (Figura 22). En el caso de esta especie no se observó una tendencia a que todas las FPs potencializaran o disminuyeran la respuesta a la PG.

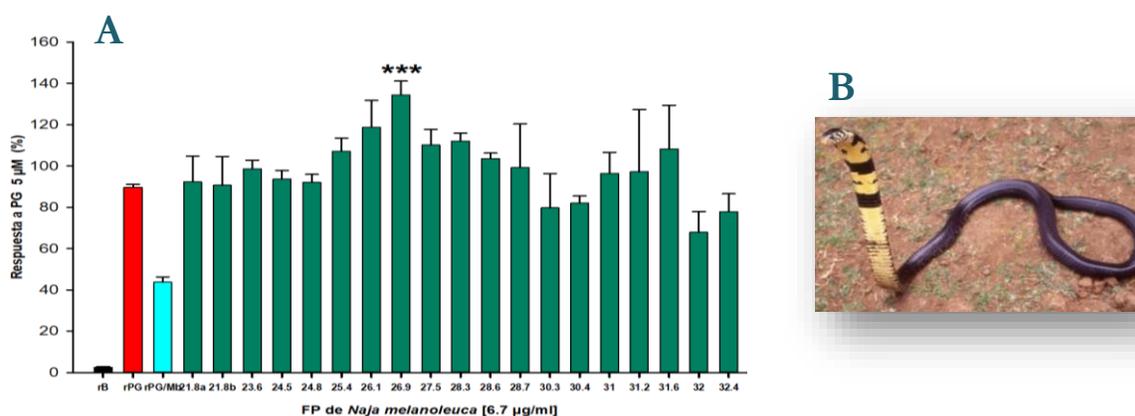


Figura 22. FPs del veneno de *Naja melanoleuca* afectan de manera diferencial el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. A) Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu M$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu g/ml$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. *** para valor $p < 0.001$. B) Imagen de la serpiente *N. melanoleuca*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

Por otro lado, cuatro FPs mostraron una disminución del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG, estas fracciones fueron: **30.3** ($11 \pm 6.6\%$), **30.4** ($9 \pm 3.4\%$), **32** ($24 \pm 10.0\%$) y **32.4** ($13 \pm 8.6\%$), sin embargo, este decremento no fue estadísticamente significativo. A pesar de ello se analizó la relación Dosis-Efecto de la FP 32.4, pues fue la única fracción que alcanzaba para dicho análisis, sin embargo, los resultados obtenidos muestran que no existe una dependencia con la dosis, al no encontrar dicha dependencia se decidió no mostrar los resultados gráficamente.

8.1.12 *Naja oxiana*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 16 FPs, sin embargo, ninguna tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta a la PG, ya que la variación en la fluorescencia no fue muy diferente a la obtenida con el control rPG (Figura 23).

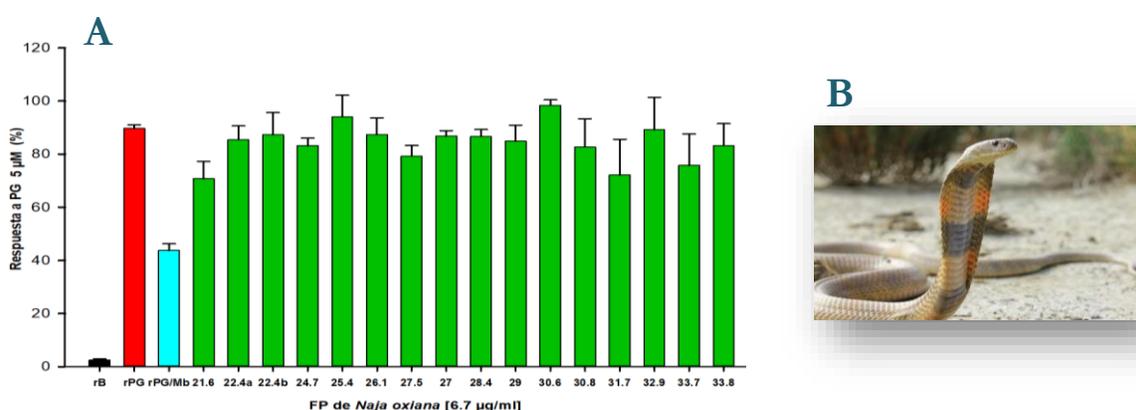


Figura 23. FPs del veneno de *Naja oxiana* no afectan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [$4 \mu\text{M}$], se incubaron con las diferentes FPs [$6.7 \mu\text{g}/\text{ml}$] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. **B)** Imagen de la serpiente *Naja oxiana*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>.

8.1.13 *Naja nubiae*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 14 FPs, de las cuales el 7% (1/14) mostraron una disminución estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Esta fracción, de ahora en adelante también denominada “HIT” fue: **21.4** ($39 \pm 5.5\%$; $p<0.001$) (Figura 24 A y B).

Se analizó la relación Dosis-Efecto de este “HIT” (Figura 24 C) y se observó que no existe una dependencia con la dosis, aunque el análisis arrojó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones [$0.67\mu\text{g}/\text{ml}$] y la [$6.7\mu\text{g}/\text{ml}$] ($P<0.05$).

A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una ligera tendencia a disminuir la respuesta a la PG, este decremento no fue estadísticamente significativo, con excepción del “HIT” encontrado. Las FPs que mostraron un mayor decremento en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG fueron: **25.9** ($8 \pm 3.6\%$), **29.7** ($16 \pm 4.1\%$), **30.1** ($16 \pm 12.7\%$), **31** ($13 \pm 8.3\%$) y **31.6** ($5 \pm 10.2\%$).

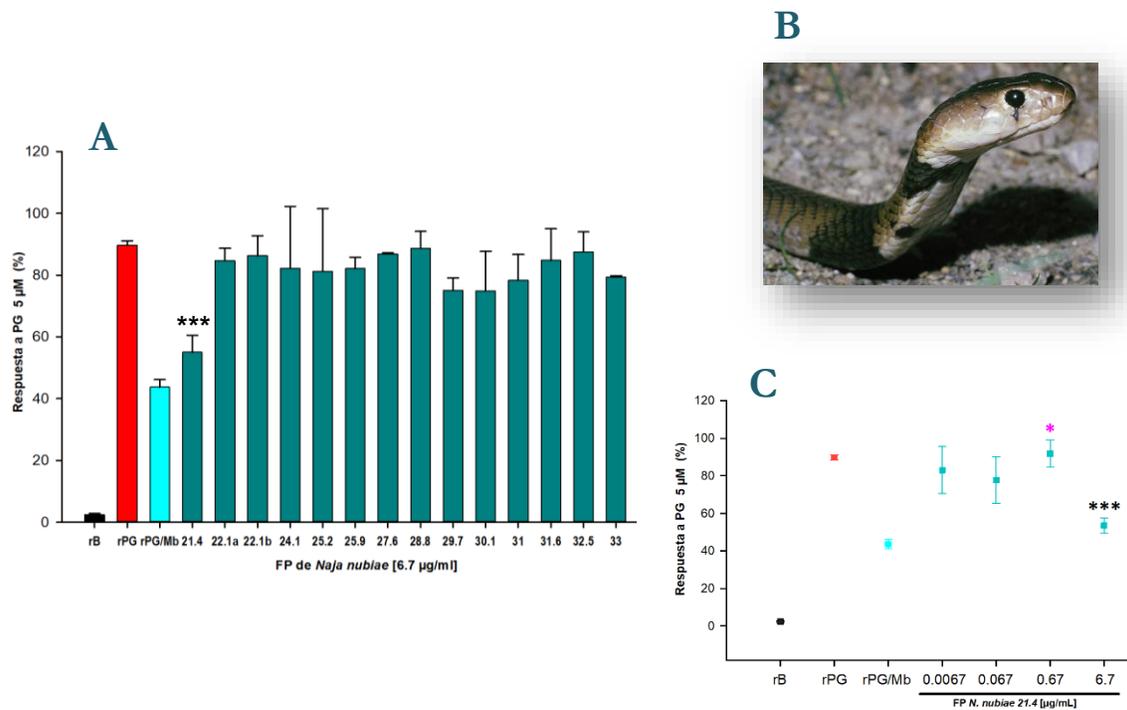


Figura 24. FPs del veneno de *Naja nubiae* disminuyen el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 $[4 \mu M]$, se incubaron con las diferentes FPs $[6.7 \mu g/ml]$ durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. *** para valor $p<0.001$. **B)** Imagen de la serpiente *N. nubiae*, tomada de <http://calphotos.berkeley.edu>. **C)** Relación Dosis-Efecto de la FP *N. nubiae* 21.4. La metodología seguida corresponde a la descrita anteriormente, sin embargo, en este caso la FP se incubó a diferentes concentraciones. El asterisco rosa indica que la respuesta de cierta concentración es estadísticamente diferente a la dosis más alta.

8.1.14 *Naja mossambica*

El veneno de esta serpiente se fraccionó en 19 FPs, de las cuales el 11% (2/19) mostraron una disminución estadísticamente significativa sobre la respuesta a la PG. Estas fracciones, de ahora en adelante también denominadas “HITS” fueron: **23.1** ($24 \pm 3.9\%$; $p<0.05$) y **34.5** ($24 \pm 8.7\%$; $p<0.05$) (Figura 25 A y B).

Se analizó la relación Dosis-Efecto de ambas fracciones. Con respecto a la fracción **23.1** (Figura 25 C) se obtuvo que no existe una dependencia con la dosis, mientras que la fracción **34.5** (Figura 26 A y B) muestra una dependencia con la dosis. El análisis de este último “HIT” mostró la existencia de una disminución de la respuesta a la PG estadísticamente significativa y dependiente de la dosis.

Al comparar todas las dosis del “HIT” 34.5 contra el control rPG solamente las dosis más altas mostraron una disminución estadísticamente significativa, estas dosis que disminuyeron el aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG fueron: **$[67 \mu g/ml]$** ($35 \pm 10.2\%$; $p<0.05$) y **$[6.7 \mu g/ml]$** ($24 \pm 8.7\%$; $p<0.05$). Sin embargo, también se encontró que la respuesta de las dosis **$[0.0067 \mu g/ml]$** y **$[0.067 \mu g/ml]$** son estadísticamente diferentes a la dosis más alta.

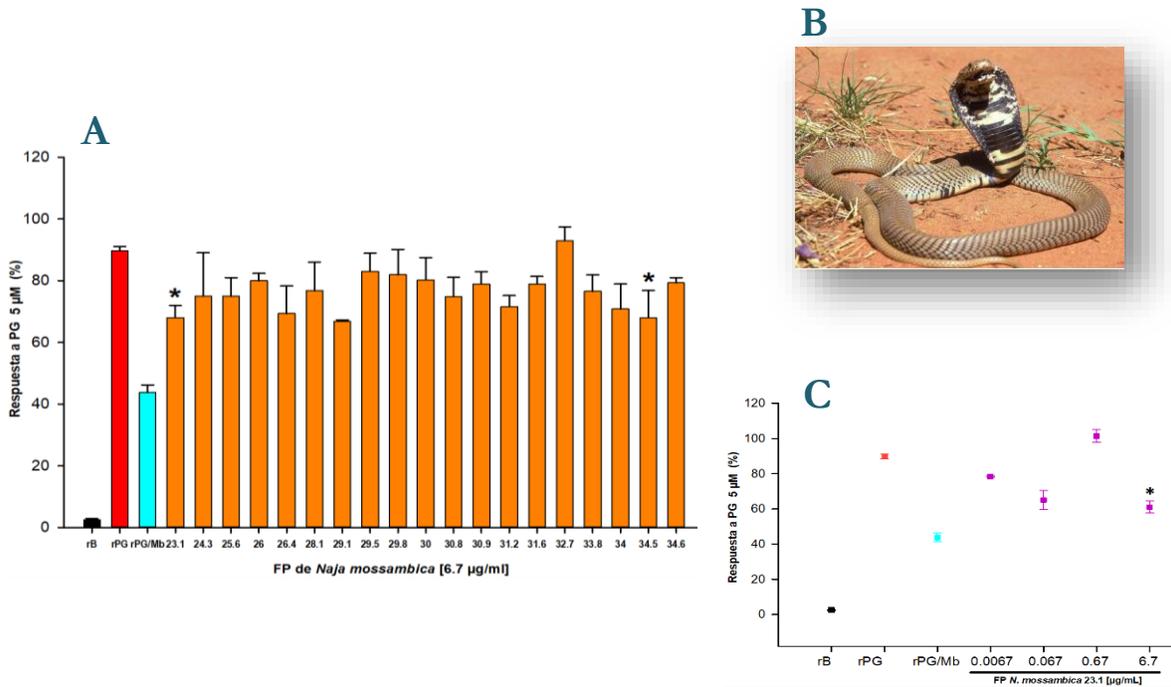


Figura 26. FPs del veneno de *Naja mossambica* disminuyen el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. **A)** Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 μM], se incubaron con las diferentes FPs [6.7 μg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. Las barras representan el promedio ± error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=2-4$ donadores diferentes por duplicado. * para valor $p<0.05$. **B)** Imagen de la serpiente *N. mossambica*, tomada de <http://reptile-database.reptarium.cz>. **C)** Relación Dosis-Efecto de la FP *N. mossambica* 23.1. La metodología seguida corresponde a la descrita anteriormente, sin embargo, en este caso la FP se incubó a diferentes concentraciones.

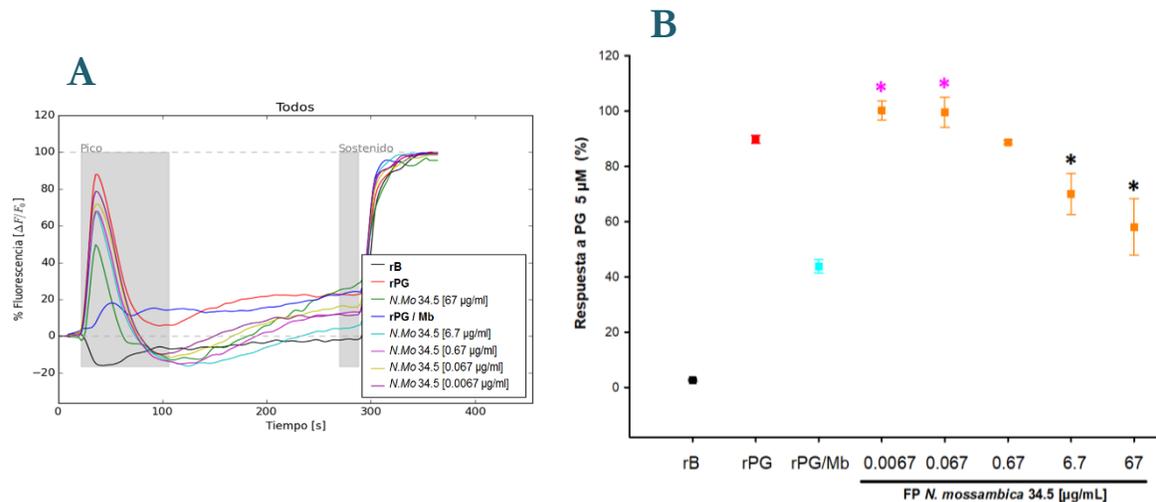


Figura 25. Fracción 34.5 del veneno de *Naja mossambica* muestra una relación Dosis-Efecto al disminuir el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por PG. Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 μM], se incubaron con diferentes dosis de la FP 34.5 ([67 μg/ml], [6.7 μg/ml], [0.67 μg/ml], [0.067 μg/ml] y [0.0067 μg/ml]) durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. **A)** Cinéticas de la respuesta a PG en presencia de la FP *N. mossambica* 34.5 a diferentes concentraciones (con un solo donador), donde se observa una dependencia con la dosis. **B)** Relación Dosis-Efecto de la FP *N. mossambica* 34.5, se observa una dependencia con la dosis. Los cuadrados representan el promedio ± error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. * para valor $p<0.05$. Los asteriscos rosas indican que la respuesta de cierta dosis es estadísticamente diferente a la dosis más alta [67 μg/ml].

A pesar de que todas las fracciones de esta especie mostraron una tendencia a disminuir la

respuesta a la PG, este decremento no fue estadísticamente significativo, con excepción de los “HITS” encontrados. Las FPs que mostraron un mayor decremento en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG fueron: **25.6** ($16 \pm 6.0\%$), **26.4** ($23 \pm 8.9\%$), **29.1** ($26 \pm 0.4\%$), **30.8** ($17 \pm 6.2\%$), **31.2** ($20 \pm 3.6\%$), **31.6** ($12 \pm 2.4 \%$), **33.8** ($15 \pm 5.3\%$), **34** ($21 \pm 8.1\%$) y **34.6** ($12 \pm 1.7\%$). Sin embargo, sólo se analizó la relación Dosis-Efecto de cuatro FPs (**31.6**, **33.8**, **34** y **34.6**) pues fueron las fracciones cuyas cantidades aún alcanzaban para realizar dicho análisis, a pesar de ello, los resultados obtenidos muestran que no hay una dependencia con la dosis. Al no encontrar dicha dependencia se decidió no mostrar los resultados gráficamente.

8.2 Primer tamizaje: Medición del cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs

El cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal inducido por la incubación de las FPs sólo se analizó con los “HITS” de *N. mossambica* (FPs **23.1** y **34.5**) y algunas fracciones que mostraron una ligera disminución estadísticamente no significativa. En total fueron 8 FPs a una concentración de $[6.7\mu\text{g}/\text{ml}]$ sometidas a este protocolo, es decir, el 4% (8/200) de las fracciones del primer tamizaje (Figura 27).

En este caso sólo se aplicaron dos controles; rB (respuesta basal donde sólo se colocó MRH) y Mb (donde se adicionó el agente bloqueante Mibefradil). Respecto al primer control (rB), hubo una ligera disminución en la fluorescencia al momento de que el equipo adicione MRH, por tal motivo se cree que dicho decremento se debe a un artefacto de adición, ya que el equipo al momento de adicionar cualquier compuesto al pozo puede levantar algunas células del fondo de la microplaca, lo que hace que disminuya la fluorescencia, por lo anterior, este fenómeno no se interpreta como una disminución real y efectiva de la $[Ca^{2+}]_i$ de la población de espermatozoides analizada.

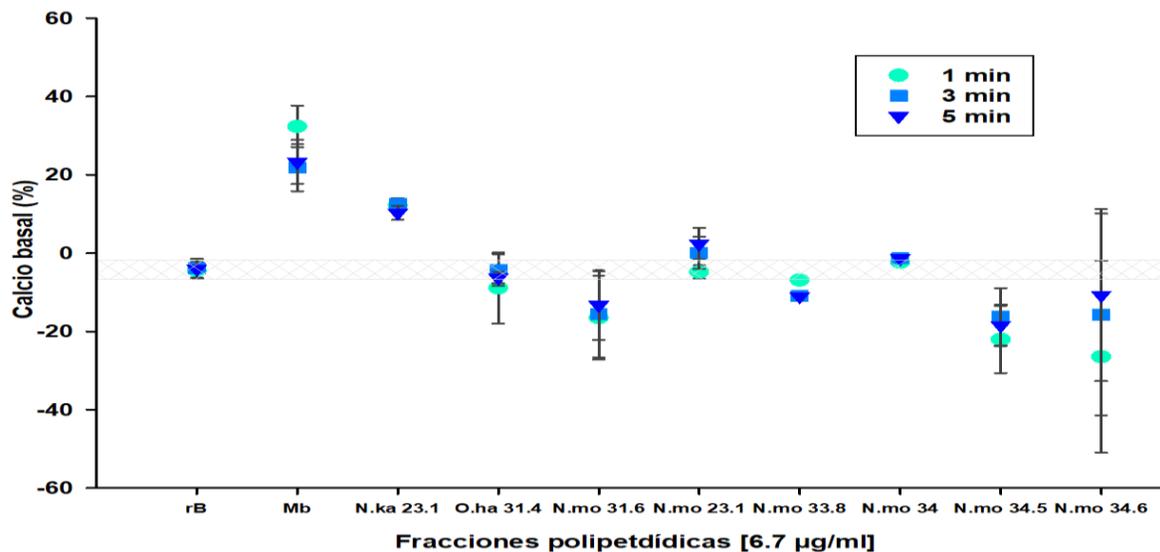


Figura 27. Efecto de diferentes FPs sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en espermatozoides humanos. Se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 $[4\mu\text{M}]$ en presencia de las FPs $[6.7\mu\text{g}/\text{ml}]$ que disminuyeron la respuesta a PG durante 20 segundos después de 1, 3 y 5 minutos de iniciada la incubación. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n = 3-4$ donadores diferentes por duplicado. Se muestra dos controles; la respuesta basal sin adicionarle ningún compuesto (Rb) y el bloqueador Mibefradil (Mb).

Por otro lado, al analizar el efecto que tienen el Mb en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG se observó que esta sólo aumenta alrededor del 40%, lo cual es una disminución significativa de la respuesta, sin embargo, al analizar la respuesta basal de los espermatozoides al Mb se observó que por sí solo induce un aumento en la fluorescencia del 20-35%. Este aumento indica que el compuesto induce una entrada de calcio a las células sin ningún otro estímulo. Para evitar efectos combinados el Mb nunca se utilizó en combinación con cualquiera de las FPs analizadas.

Al analizar las ocho fracciones, solamente *N. kaouthia* (N.ka) 23.1 aumentó la fluorescencia basal (Figura 27), el resto de las FPs no mostraron cambios significativos respecto al control rB. Estas fracciones fueron: *O. Hannab* (O. ha) 31.4, *N. mossambica* (N. mo) 31.6, 23.1, 33.8, 34, 34.5 y 34.6.

Ya que el “HIT” *N. mossambica* 34.5 mostró una dependencia con la concentración al evaluar el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG, se procedió a evaluar el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal a diferentes dosis a lo largo de diferentes tiempos durante el periodo de incubación (Figura 28). El efecto de esta fracción se caracterizó por mostrar una disminución no significativa de la fluorescencia a cualquier dosis.

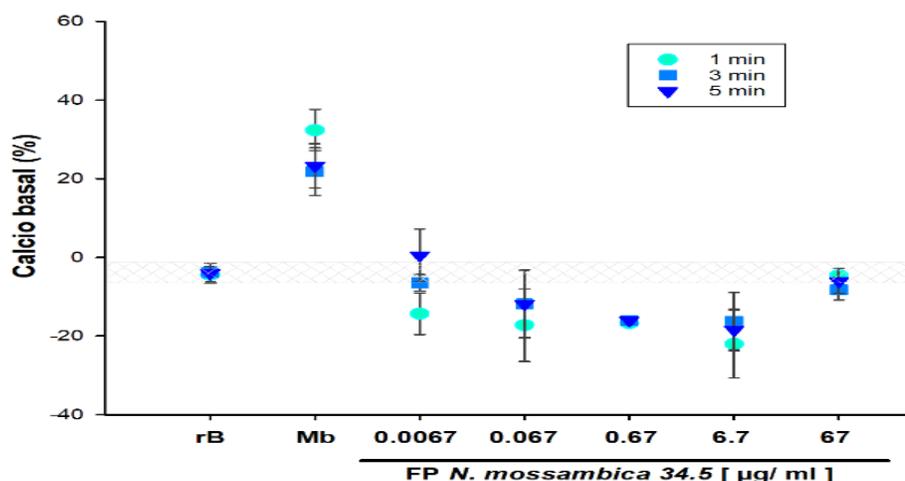


Figura 28. Relación Dosis-Efecto del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal en presencia de la FP *N. mossambica* 34.5. Se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], en presencia de las FP *N. mossambica* a diferentes dosis ([67 µg/ml], [6.7 µg/ml], [0.67 µg/ml], [0.067 µg/ml] y [0.0067 µg/ml]) durante 20 segundos después de 1, 3 y 5 minutos de iniciada la incubación. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). n = 2-4 donadores diferentes por duplicado.

En el caso de la concentración más baja [0.0067 µg/ml] se observó claramente cómo se recupera la fluorescencia con el paso del tiempo. Al cabo de los cinco minutos de incubación con la FP 34.5 la fluorescencia regresa al estado basal reportado en los primeros 30 segundos de lectura. Con respecto a las siguientes tres concentraciones también se observó una disminución de la fluorescencia, sin embargo, esta disminución no logra regresar al estado basal con el paso del tiempo.

A pesar de lo anterior mencionado, la concentración más alta [67 µg/ml] tuvo un efecto diferente en estas poblaciones de espermatozoides, ya que, a pesar de que disminuye la fluorescencia, esta disminución es ligeramente mayor a la del control rB y se mantiene, puesto que no se observaron cambios significativos con el paso del tiempo.

8.3 Segundo tamizaje: Medición del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG

Como se mencionó anteriormente, debido a que la cantidad de cada una de las FPs analizadas en el primer tamizaje que mostraron algún efecto era muy poca y solo alcanzó para realizar las pruebas anteriormente mencionadas, se realizó un segundo fraccionamiento de algunos venenos (*N. nubiae*, *N. mossambica*, *N. melanoleuca*, *N. kaouthia* y *N. siamensis*), por lo cual, se realizó un segundo tamizaje con estas nuevas FPs midiendo de nuevo el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG en presencia de las nuevas FPs (Figura 29).

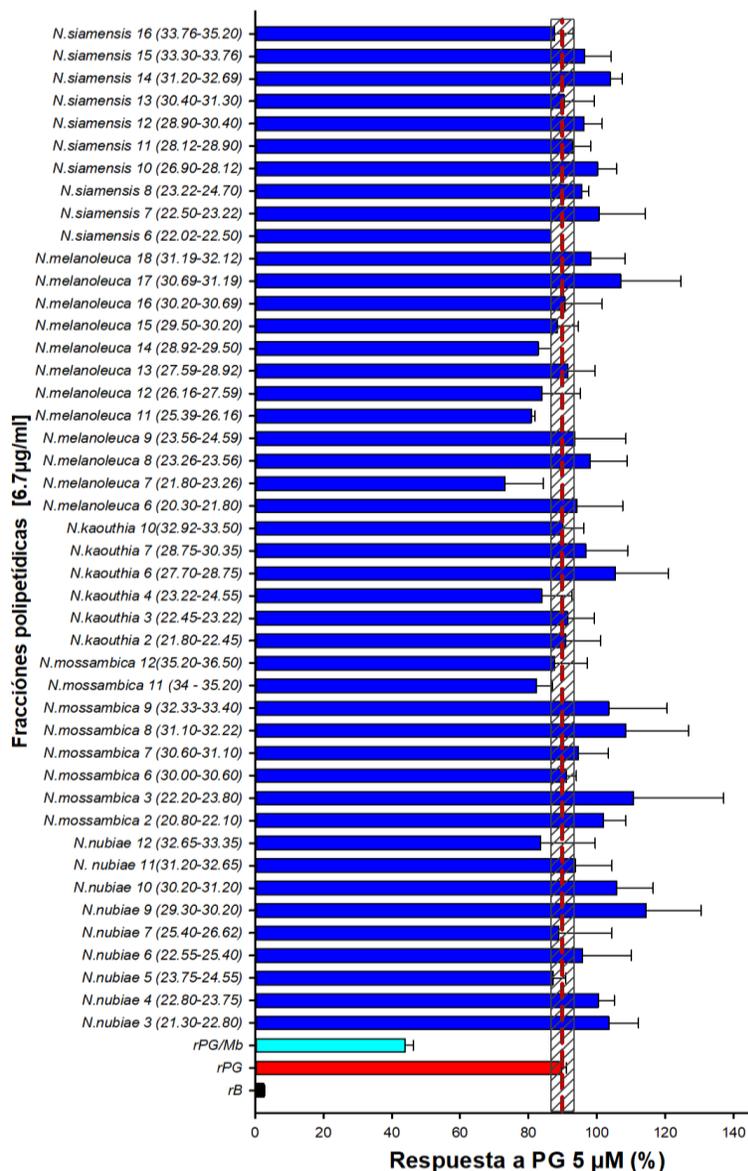


Figura 29. Segundo tamizaje. Efecto de diferentes FPs sobre la respuesta a la PG en espermatozoides humanos. Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 μM] se incubaron con las diferentes FPs [6.7 μg/ml] durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG. La barra en color negro representa al control rB, la de color rojo al rPG y la azul claro rPG/Mb. La línea roja indica el promedio de la rPG y el recuadro gris su error estándar. Las barras representan el promedio ± error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). n = 3-4 donadores diferentes por duplicado.

En este caso ninguna fracción mostró una potencialización o disminución estadísticamente significativa, sin embargo, se analizó la dependencia con la concentración de la FP *N. mossambica* 11 (A pesar de no ser significativo, esta FP a una [6.7 µg/ml] disminuyó $19 \pm 4.18\%$ la respuesta a PG), ya que engloba a la fracción **34.5**, que en el anterior fraccionamiento disminuyó la respuesta a la PG y mostro una dependencia con la dosis.

En la gráfica Dosis-Efecto perteneciente a la fracción *N. mossambica* 11 (Figura 30 A) se observa que la concentración más alta [67 µg/ml] ($45 \pm 0.01\%$; $p < 0.01$) es estadísticamente diferente del control rPG. A pesar de ser la única fracción que mostró una diferencia estadísticamente significativa, visualmente podemos observar una ligera dependencia de la dosis, ya que se ve una disminución en la fluorescencia de las medias de las tres concentraciones más altas.

Con respecto al cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal se observó una disminución de la fluorescencia al adicionar todas las concentraciones con excepción de la concentración más alta [67 µg/ml], en este caso la fluorescencia fue aumentado con el paso del tiempo, hasta llegar a aumentar casi 20% a los 5 minutos de incubación con la fracción *N. mossambica* 11 (Figura 30 B).

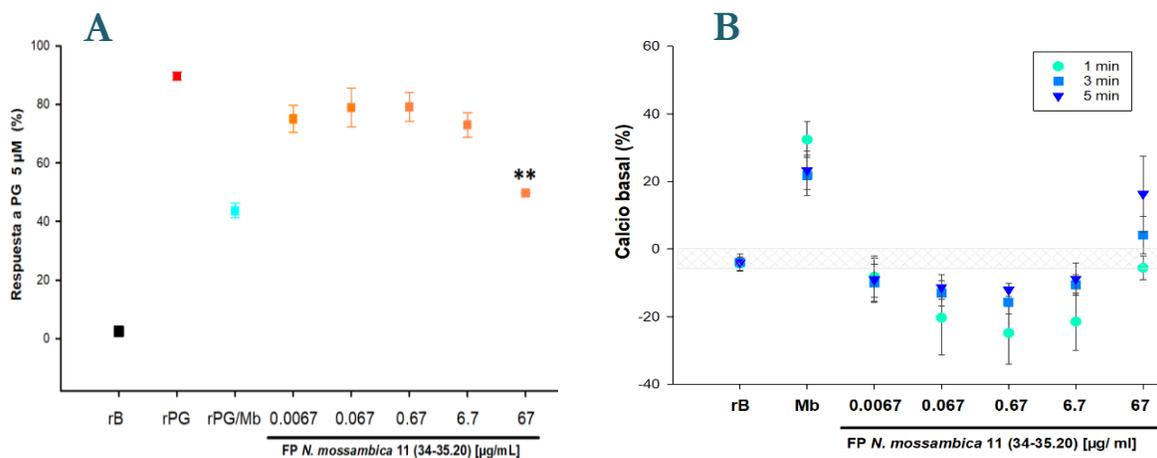


Figura 30. Relaciones Dosis-Efecto de la FPs *N. mossambica* 11 (34-35.20). Los espermatozoides humanos cargados con Fluo 4 [4 µM], se incubaron con diferentes dosis de la FP 34.5 ([67 µg/ml], [6.7 µg/ml], [0.67 µg/ml], [0.067 µg/ml] y [0.0067 µg/ml]). Los puntos representan el promedio \pm error estándar del cambio en la amplitud de la fluorescencia (ΔF) normalizada respecto a la fluorescencia basal (F_{min}), utilizando ionomicina como el máximo de intensidad de fluorescencia ($F_{max}=100\%$). $n=3-4$ donadores diferentes por duplicado. **A)** Relación Dosis-Efecto sobre la respuesta a la PG en espermatozoides humanos al pre-incubar con la FP *N. mossambica* 11 durante 5 minutos y posteriormente se registró el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG, se observa una ligera dependencia con la dosis. Los asteriscos negros indican que la respuesta de dicha dosis es estadísticamente diferente al control rPG. **B)** Relación Dosis-Efecto del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ basal en presencia de diferentes dosis de la FP *N. mossambica* 34.5 durante 20 segundos después de 1, 3 y 5 minutos de iniciada la incubación. ** para valor $P < 0.01$.

9 Discusión

El movimiento de iones a través de la membrana de los espermatozoides es capaz de regular el nado de estas células y por ende su capacidad para fecundar al óvulo (Darszon, 2007). El flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de estas células se da principalmente a través del canal iónico CatSper. Estudios anteriores reportan que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por PG es necesario para que se desencadenen múltiples respuestas fisiológicas necesarias para la fecundación. (Ren & Xia, 2010; Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Este aumento inicia por la unión de la PG a su receptor no genómico (localizado en la membrana plasmática, a diferencia de los situados en el citosol). Se ha propuesto que este receptor es una serina hidrolasa, cuyo sustrato son los endocannabinoides, y que la actividad de esta enzima libera a CatSper de la inhibición (Miller *et al.*, 2016).

El que CatSper sea exclusivo de los espermatozoides e indispensable para la fecundación, lo convierte en un blanco ideal para atacarlo farmacológicamente y poder desarrollar tanto un anticonceptivo masculino como un medicamento que potencialice la fertilidad masculina (Lishko *et al.*, 2011; Lishko, 2016; Martins Da Silva *et al.*, 2017).

Por lo anteriormente mencionado, el presente trabajo se enfocó en medir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la PG en espermatozoides no capacitados, buscando un agente capaz de bloquear dicha respuesta y en consecuencia la funcionalidad del canal CatSper.

El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso largo, costoso y de alto riesgo (Martins Da Silva *et al.*, 2017). El número de toxinas biológicas disponibles para bioensayos se ha incrementado de manera significativa en los últimos años (Kalia *et al.*, 2015), lo que ha dado lugar a tener sentido el utilizar ensayos de alto rendimiento (HTS) para abarcar el mayor número de toxinas posibles en un mismo experimento.

En el caso de este trabajo fue posible evaluar 245 FPs en el lapso de un año, ya que los experimentos se realizaron mediante un ensayo de alto rendimiento con el equipo FlexStation 3[®], el cual funciona de manera automatizada.

La estandarización de los protocolos para utilizar poblaciones de espermatozoides humanos en este equipo y la programación del mismo, la realizó la Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta y el equipo de trabajo del LaNCA. El tiempo transcurrido en dicha estandarización (alrededor de un año) se debió a que se tenían que encontrar las condiciones idóneas para realizar los experimentos mostrados en la presente tesis. Vale la pena recalcar que los espermatozoides, al ser células móviles, no se adhieren por sí solas al fondo de la microplaca, lo que representa una dificultad experimentalmente.

A pesar de que estudios anteriores reportan que los espermatozoides capacitados son más sensibles a la PG (Strünker *et al.*, 2011), la Dra. Loza (resultados no publicados) encontró que al utilizar la estrategia experimental realizada en esta tesis, no hay diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta a PG de espermatozoides capacitados y no capacitados. Cabe aclarar que sí existe una diferencia entre ambas respuestas, pero al no ser estadísticamente significativa, no se tomó en cuenta dicha desigualdad. Lo más probable es que esta diferencia

con lo descrito en la literatura se debe a la metodología seguida y a las condiciones del experimento.

Es importante mencionar que al pre-incubar con Mb diferentes poblaciones de espermatozoides humanos se observó que este compuesto sólo aumenta un 40% la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG, esto se debe a que el compuesto por sí solo induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal del 20-35%. El que el Mb aumente por sí solo la $[Ca^{2+}]_i$ se debe a que es una base débil y las bases débiles son capaces de elevar el pH de los compartimientos ácidos, ya que se acumulan en dichos compartimientos y se perturba su estado fisiológico. El acrosoma al ser un organelo ácido se ve afectado por el Mb, esto ocasiona que se eleve el pH_i (Chávez *et al.*, 2017) del espermatozoide y por consiguiente se eleva la $[Ca^{2+}]_i$ al activarse el canal CatSper.

En este trabajo se realizaron dos tamizajes, el primero con 200 FPs y el segundo con 45, dando un total de 245 FPs analizadas. De estas, tan solo el 1.22% (3/245) de los compuestos mostraron una disminución estadísticamente significativa de la respuesta a PG.

El motivo por el cual se realizaron dos tamizajes fue que la cantidad de FPs era muy reducida y se necesitaba mayor cantidad para poder realizar más estudios con las FPs que mostraron algún efecto. Sin embargo, al volver a fraccionar los venenos de las especies que mostraron una disminución, los tiempos de retención cambiaron, es decir, estrictamente no obtuvimos las mismas FPs analizadas en el primer tamizaje. Por lo anterior mencionado se evaluaron de igual manera las 45 FPs nuevas.

El que los tiempos de retención no coincidieran con exactitud se debe a que los venenos no pertenecían al mismo lote. Otra circunstancia que pudo afectar la separación por RP-HPLC de estas FPs, es el uso que tenga la columna con la que se fraccionaron los venenos. Las FPs utilizadas en el segundo fraccionamiento no fueron tan puras como las utilizadas en el primer tamizaje, ya que las segundas FPs correspondieron a intervalos de tiempos de retención, mientras que las primeras pertenecían a un único tiempo de retención.

Al evaluar los resultados por especies del primer tamizaje, se observó claramente que algunas especies tienen una tendencia a aumentar la respuesta a PG, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa. Este es el caso de las especies *O. Hannah*, *W. aegyptia*, *N. haje*, *N. annulifera*, *N. siamensis*, *N. nivea* y finalmente *N. nigricollis*, aunque de esta última, la tendencia que se observa es muy pequeña. La posible explicación para este aumento puede ser que las FPs capaces de aumentar la respuesta a PG se unan de igual manera que la PG a la mSH y por ende se remueva una mayor cantidad de AGs o que las FPs tengan un efecto directo sobre el canal y lo puedan potencializar.

Las especies *N. nubiae* y *N. mossambica*, son las únicas que mostraron una tendencia a disminuir la respuesta a PG y dentro de las cuales se encontraron los “HITS” (***N. nubiae* 21.4** y ***N. mossambica* 23.1** y **34.5**).

Los “HITS” ***N. nubiae* 21.4** y ***N. mossambica* 23.1** no mostraron un efecto dependiente de la dosis, solamente la concentración más alta [6.7 µg/ml] de estas FPs produjo una disminución estadísticamente significativa de la respuesta a PG (P<0.001 y P<0.05 respectivamente).

El resto de las especies analizadas o la variación en la fluorescencia no fue muy diferente a la obtenida con el control como *B. multicoloratus*, *N. pallida* y *N. oxiana* o no muestran una tendencia, sino que algunas FPs disminuyen y otras potencializan la respuesta como *N. kaouthia* y *N. melanoleuca*.

En relación con la evaluación del segundo tamizaje, ninguna especie mostró una tendencia a disminuir o potencializar la respuesta a PG. A pesar de ello, se evaluó la relación Dosis-Efecto de la FP ***N. mossambica* 11**, encontrando así una ligera dependencia con la dosis, no obstante, sólo la concentración más alta [67 µg/ml] mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto al control rPG. Sin embargo, al medir el efecto de esta concentración sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal se observó un aumento de la fluorescencia de casi el 20% a los cinco minutos de incubación, lo cual podría indicar que, al elevar la FP la $[Ca^{2+}]_i$ ocasiona que las células ya no tengan la capacidad de reaccionar igual al momento de estimular con PG. Es posible que esta diferencia entre la FP ***N. mossambica* 11** y la **34.5** se deba a su composición, ya que la FP **11** engloba un rango de tiempos de retención, lo cual puede ocasionar que actúe de manera distinta a la FP **34.5**.

Por otro lado, King y colaboradores, reportaron que los venenos de algunas arañas, caracoles marinos del género *Conus* y reptiles, incluidas las serpientes, son capaces de bloquear canales de Ca^{2+} (King *et al.*, 2015). En este trabajo encontré que venenos pertenecientes a serpientes del género *Naja* son capaces de disminuir el flujo de Ca^{2+} inducido por PG, cuya principal vía de entrada es CatSper, sin embargo, también encontré que dichos venenos pueden potencializar este flujo.

Martins Da Silva y colaboradores en el 2017 realizaron una investigación con un protocolo muy similar al presentado en este trabajo, no obstante su objetivo era encontrar compuestos capaces de potencializar dicha respuesta, por lo cual, aparte de evaluar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la PG, también evaluaron el movimiento flagelar y la capacidad de las células para: hiperactivarse, llevar a cabo la reacción acrosomal y penetrar el óvulo (Martins Da Silva *et al.*, 2017). Por lo anterior, si quisiéramos continuar con la investigación partiendo de estas FPs potencializadoras, tendríamos que realizar las pruebas mencionadas anteriormente con dichas FPs. Estas fracciones son de gran importancia puesto que pueden sentar las bases para desarrollar un medicamento que ayude a la infertilidad masculina.

En otro orden de ideas, anteriormente se creía que el receptor de PG no genómico estaba localizado dentro del complejo del canal CatSper, sin embargo, investigaciones recientes mencionan que el mecanismo de acción de la PG puede ser de manera indirecta, ya que Miller y su grupo reportan que la PG se une a la serina hidrolasa denominada ABHD2 y al hacer la extracción de dicha hidrolasa no identificaron ninguna subunidad del canal CatSper, lo que sugiere que esta hidrolasa no es un componente del canal (Miller *et al.*, 2016).

Con lo anterior mencionado podemos discutir desde diferentes puntos de vista los resultados obtenidos del “HIT” ***N. mossambica* 34.5** y de la fracción ***N. mossambica* 11**:

- I. Se observa que al aumentar la concentración de las FPs ***N. mossambica* 34.5** y **11** disminuye la respuesta a PG, lo cual claramente sugiere una relación Dosis-Efecto. Este resultado puede explicarse ya sea porque la FP actúe directamente sobre el canal o sobre

el receptor de la PG (ABHD2). Si actuara sobre ABHD2 podría impedir que la PG se una a esta hidrolasa y por lo tanto no se elimine de igual manera al inhibidor endógeno endocannabinóide araquidonilglicerol, encargado de mantener a CatSper cerrado (Miller *et al.*, 2016).

II. Estas FPs podrían inactivar al canal CatSper al promover el mecanismo de retroalimentación (aún no identificado) encargado de producir AGs, los cuales son derivados de los lípidos de la membrana y normalmente se producen a través de la reacción del ácido araquidónico con otra molécula endógena (glicerol). La enzima que lleva a cabo este proceso se llama diacilglicerol lipasa (Seshata, 2013). En este caso las FPs no disminuirían la respuesta a PG, sino que al adicionar PG y la FP se dan ambos procesos a la vez, el de activación y el de inhibición del CatSper, por lo mismo también es dependiente de la concentración, entre más alta sea la concentración se dará una mayor inactivación del canal.

III. Se ha propuesto que existen otros mecanismos que están involucrados en la activación del canal CatSper, por lo cual estas FPs podrían modificar de diferentes maneras a los espermatozoides. Ejemplo de esto sería que dichas fracciones modificaran el pH_i al modular de alguna forma al canal Hv1, el cual se activa normalmente por la despolarización de la membrana, por un medio extracelular alcalino, por el endocannabinóide anandamida y por la eliminación de zinc extracelular (Lishko & Kirichok, 2010).

Otra posible explicación sería que las fracciones modificaran la regulación del canal de potasio KSper. Aún no es claro cómo se modula este canal, sin embargo, investigaciones recientes mencionan que el Ca^{2+} intracelular y el pH_i lo estimulan y la PG lo inhibe. Durante la capacitación, este canal se encarga de hiperpolarizar a los espermatozoides, sin embargo, al inhibirse en presencia de PG puede despolarizar la membrana de los espermatozoides y facilitar la entrada de Ca^{2+} a través de canales CatSper (Mannowetz *et al.*, 2013; Geng *et al.*, 2017). Por lo anterior, estas FPs podrían inactivar al canal CatSper, al alterar al canal KSper induciendo una hiperpolarización y evitando que la membrana del espermatozoide se despolarice.

Se descubrió que al inhibir farmacológicamente la hidrolasa se eliminó la activación del CatSper inducido por PG, pero al inducir la activación de este canal por PGE1 actúa de manera normal (Miller *et al.*, 2016). Es importante destacar esto, ya que los experimentos realizados en el presente trabajo solamente se midió la respuesta a PG y por ende las FPs que mostraron una inhibición de dicha respuesta pueden, no inhibir la respuesta a prostaglandinas y por consiguiente no bloquear al canal sino sólo inhibir el flujo de Ca^{2+} en respuesta a la PG.

Se esperaba que la FP *N. mossambica* 34.5 y 11 funcionaran como bloqueadores específicos del canal CatSper al estimular con PG, al no serlo; otra vía de señalización diferente en la que se puede evaluar las FPs en la actividad de este canal es a través de la estimulación con prostaglandinas y ver si dichas FPs también inhiben el flujo de Ca^{2+} en presencia de prostaglandinas. Cabe aclarar que no se consideró antes evaluar las FPs con PG y prostaglandinas

puesto que cuando se empezó el presente estudio no se sabía que ambas hormonas actúan de manera diferente sobre el canal CatSper.

Por otro lado, sería pertinente analizar como los “HITS” afectan el pH_i para descartar o afirmar que las FPs afectan el flujo de Ca²⁺ en respuesta a la PG o que este flujo se ve afectado en respuesta a alguna modulación del pH_i.

Ya que este ensayo se realizó a nivel poblacional fue necesario adicionar ionomicina para tener un control del número de células que estaban respondiendo y que la respuesta a PG no se viera afectada por células que murieron a lo largo del experimento. Considerando lo anterior, también sería importante analizar los “HITS” por metodologías de célula única, para poder así saber si todas las células de la misma población se comportan de igual manera ante la FP o es que solamente una cierta proporción del total de los espermatozoides medidos responden al estímulo y por lo mismo se ve disminuida o potencializada la respuesta a la PG.

Continuando con esta idea, también es necesario evaluar a través de fluorescencia de célula única y/o electrofisiología la selectividad de estos HITS, es decir, saber si solamente inhiben al CatSper o si modifican la actividad de otros canales iónicos, o incluso otros blancos moleculares, tanto del mismo espermatozoide como de otras células.

Este trabajo deja abierto un campo de investigación que da pie a conocer cómo interactúan las FPs constituyentes de venenos animales con el canal CatSper, los mecanismos de acción directos e indirectos por los que se afecta farmacológicamente al canal y para seguir buscando un fármaco que pueda bloquear con suficiente eficacia, selectividad y seguridad farmacológicas al canal CatSper y logre funcionar como un posible compuesto activo de un futuro anticonceptivo masculino.

10 Conclusiones

1. Se encontraron 3 FPs capaces de disminuir la respuesta a PG (*N. nubiae* 21.4 y *N.mossambica* 23.1 y 34.5).
2. Solamente los resultados obtenidos con ***N.mossambica* 34.5 y 11** sugirieron una posible relación Dosis-Efecto.
3. Se encontraron 38 FPs capaces de aumentar la respuesta a PG, estas fracciones podrían concebirse como posibles potenciadores de la movilidad de espermatozoides para un futuro análisis.

11 Perspectivas

1. Realizar la misma estrategia experimental con prostaglandinas para ver si también disminuye el flujo de Ca^{2+} en presencia de la FP *N.mossambica* 11.
2. Realizar experimentos de célula única para investigar cómo se comportan de manera individual los espermatozoides ante la FP *N.mossambica* 11.
3. Evaluar por electrofisiología la selectividad de la FP *N.mossambica* 11, para saber si solamente inhiben al CatSper o si modifican otros canales tanto del mismo espermatozoide como de otras células.
4. Evaluar la relación Dosis-Efecto de las FPs que mostraron una potencialización de la respuesta a PG.
5. Evaluar cómo se afecta el movimiento flagelar por la exposición a las toxinas que potencializan la respuesta a PG.

12 Apéndices

12.1 APÉNDICE 1: Análisis estadístico de controles

Los experimentos realizados en este trabajo fueron mediante un ensayo de alto rendimiento o HTS por sus siglas en inglés (high-throughput screening). El análisis estadístico de los experimentos determinados como controles rB, rPG y rPG/Mb consistió en tomar todos los datos de la muestra de cada condición y comprobar la confiabilidad de cada uno de estos resultados al establecer un nivel de confianza del 95% (Figura 31), donde los límites fueron marcados por una $z = 1.96$ y -1.96 . Una vez determinada la confiabilidad de nuestros datos (Figura 32), se sacó el promedio de cada condición y se estableció como el valor de referencia para realizar la estadística de los resultados.

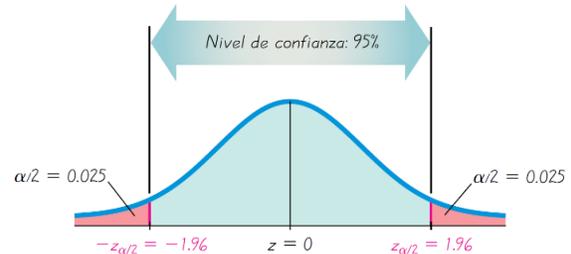


Figura 31. Ejemplo de la estadística seguida para los controles. Se muestra el intervalo de confianza correspondiente al 95%. Figura tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=Z+PRIMA&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwib4qGB2pDTAhXrsdQKHV63CdIQ_AUIBigB&biw=1280&bih=889#tbm=isch&q=distribucion+normal+95+confianza*&imgdii=N0SE6nmjXEiXbM:&imgre=vhIHjelbWYgTtM

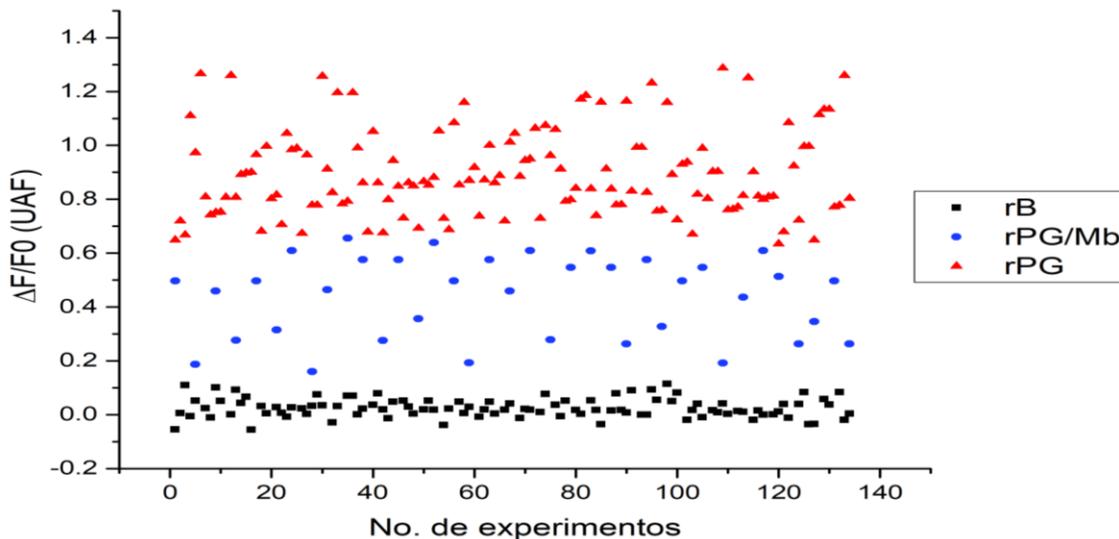


Figura 32. Gráfica que muestra espacialmente la intensidad de fluorescencia de cada control. Los cuadros negros corresponden al control rB, el cual se mantiene cerca del cero, ya que solo se adiciona MRH. Los círculos azules representan al control rPG/Mb, donde se adiciona el bloqueador mibefradil, por lo cual la intensidad de fluorescencia se ve disminuida en respuesta a la PG. Por último, los triángulos rojos corresponden al control rPG, donde se observa una mayor fluorescencia, ya que, es la respuesta que tienen los espermatozoides en condiciones fisiológicas al ser expuestos a la PG.

Adicionalmente se realizó el análisis estadístico para obtener el valor Z' y comprobar la validez del experimento (Figura 33). El factor Z' es un parámetro característico para evaluar la calidad de un experimento sin la intervención de los compuestos a probar y principalmente es usado para evaluar HTS (Zhang *et al.*, 1999).

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{C+} + 3\sigma_{C-})}{\mu_{C+} - \mu_{C-}}$$

Se dice que, idealmente entre los controles a evaluar en este tipo de experimentos debe haber una separación significativa a partir del promedio de \pm tres desviaciones estándar ($\pm 3\sigma$) de cada condición (Figura 33), lo que daría una $Z' = 0.5$ (Zhang *et al.*, 1999). En este caso en la figura 28 se observa que entre el control **rB** y **rPG** a partir de las líneas punteadas ($\pm 3\sigma$) hay una separación relativamente corta por lo cual se obtiene una $Z' = 0.3$.

Este resultado es aceptable, considerando el número de experimentos y las células utilizadas, ya que por lo general este parámetro se aplica para HTS con un rango que va de 50 000 a 500 000 compuestos y se utilizan líneas celulares para los experimentos (Zhang *et al.*, 1999). En el caso de este ensayo fueron 245 compuestos analizados, utilizando espermatozoides humanos, los cuales son células normales, que cuentan con movimiento propio, altamente sensibles y muy variables entre donadores y entre ellas mismas.

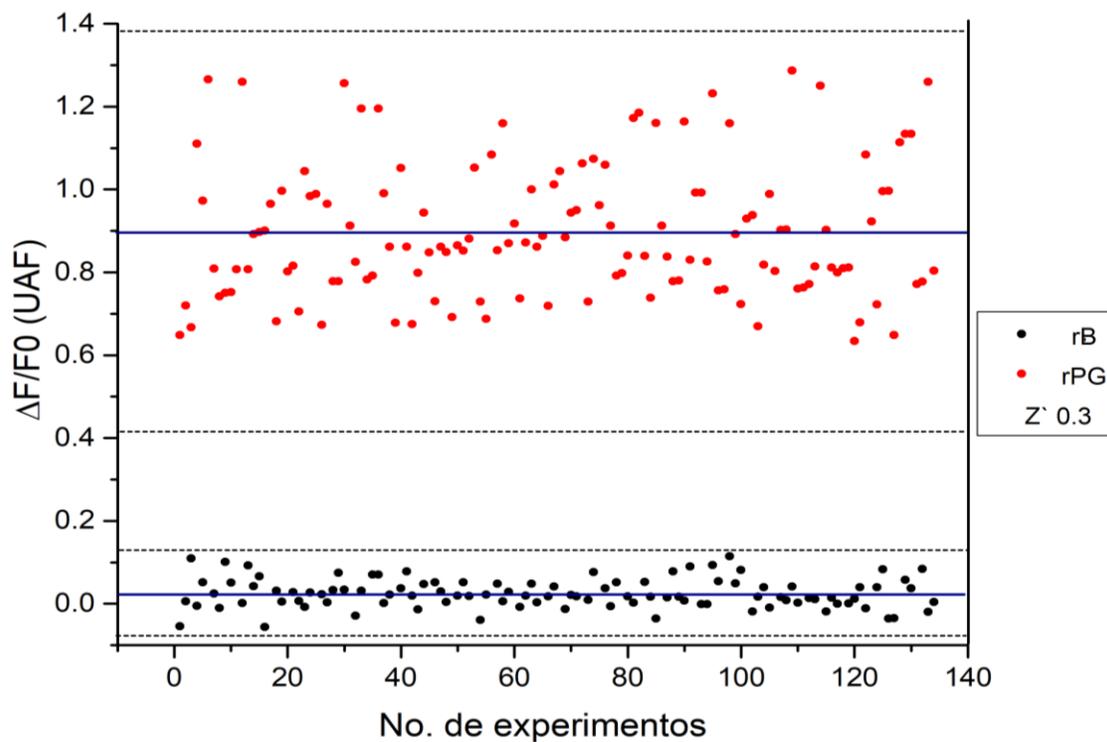


Figura 33. Gráfica que ejemplifica el cálculo del factor Z' . Parámetro característico para evaluar la calidad de los resultados de un experimento de tipo HTS. Las líneas azules representan el promedio de cada control, las líneas punteadas representan $\pm 3\sigma$ a partir del promedio. Se observa claramente que ningún dato se aleja más de tres desviaciones estándar de su media. El control Rb se encuentra representado por puntos negros, donde se observa muy poca variación, esto se debe a que es una respuesta basal de los espermatozoides donde no se aplica ningún estímulo, mientras que los puntos rojos representan al control rPG, a diferencia del control anterior, observamos una gran dispersión, debida a la característica variabilidad entre cada distinto donador e inclusive entre los espermatozoides de un mismo individuo frente al estímulo con PG. Por lo anterior, de toda la muestra analizada se calcula un promedio, el cual representará a toda la muestra. Finalmente, al realizar el análisis se obtiene un factor $Z' = 0.3$.

13 Bibliografía

- Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LLH, Kahrizi K, Najmabadi H & Smith RJH (2009) Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am. J. Hum. Genet.* **84**: 505–510 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.004>
- Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, Omoto K, Owen RM, Pryde DC, Sidders B, Skerratt SE, Stevens EB, Storer RI & Swain NA (2013) Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *J Med Chem* **56**: 593–624 Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/jm3011433>
- Biodiversity explorer Available at: http://www.biodiversityexplorer.org/reptiles/squamata/serpentes/elapidae/naja_nivea.htm
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB & Strünker T (2012) The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* **31**: 1654–1665 Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.30>
- Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, José O, Torres P, Nishigaki T, Treviño CL & Darszon A (2017) Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J. Cell. Physiol.*: 1–13 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.26262>
- Chung JJ, Miki K, Kim D, Shim SH, Shi HF, Hwang JY, Cai X, Iseri Y, Zhuang X & Clapham DE (2017) Catsper?? regulates the structural continuity of sperm ca2+ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife* **6**: 1–25
- Darszon A (2007) Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología* **14**: 30–42 Available at: http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_03.pdf
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C & Beltrán C (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* **131**: 977–988
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C & Trevino CL (2011) Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**: 1305–1355 Available at: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00028.2010>
- Davidson MW (2015) Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence - Basic Concepts in Fluorescence. Available at: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html> [Consultado diciembre 4, 2017]
- Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z & Krausz C (2010) Guía clínica sobre la infertilidad masculina. En *European Association of Urology* p 82.
- Fernández Álamo AM & Rivas G eds. (2007) Niveles de organización en animales la prensa. México: UNAM, Facultad de Ciencias
- Geng Y, Ferreira JJ, Dzikunu V, Butler A, Lybaert P, Yuan P, Magleby KL, Salkoff L & Santi CM (2017) A genetic variant of the sperm-specific SLO3 K⁺ channel has altered pH and Ca²⁺ sensitivities. *J. Biol. Chem.* **292**: 8978–8987 Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M117.776013>

- Gilbert SF (2000) Developmental Biology -- NCBI Bookshelf. *Dev. Biol.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dbio>
- Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Anastasia A & Giojalas LC (2008) Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One* **3**: 1–9
- Hille B (2001) Ion Channel of Excitable Membranes 3rd ed. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.
- Ho K, Wolff C & Suarez SS (2009) CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**: 345–350
- Invitrogen (2011) Fluo Calcium Indicators. *Mol. Probes*: 1–5
- Kalia J, Milescu M, Salvatierra J, Wagner J, Klint JK, King GF, Olivera BM & Bosmans F (2015) From foe to friend: Using animal toxins to investigate ion channel function. *J. Mol. Biol.* **427**: 158–175 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.027>
- King GF, Gentz MC, Escoubas P & Nicholson GM (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* **52**: 264–276
- King GF, Rotella D, Martinez A & Fox D (2015) Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-015-2962-3>
- Kini RM & Doley R (2010) Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon* **56**: 855–867 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.010>
- Kirichok Y, Navarro B & Clapham DE (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* **439**: 737–740
- Lishko P V. (2016) Contraception: Search for an Ideal Unisex Mechanism by Targeting Ion Channels. *Trends Biochem. Sci.* **41**: 816–818
- Lishko P V., Botchkina IL & Kirichok Y (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**: 387–391 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09767>
- Lishko P V. & Kirichok Y (2010) The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J. Physiol.* **588**: 4667–4672
- Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L & Michalovich D (2003) Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterization of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 53–67
- Long JZ & Cravatt BF (2011) The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. *Chem Rev.* **111**: 6022–6063
- López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi CM, Darszon A & Treviño CL (2014) Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **20**: 619–629
- Mannowetz N, Naidoo NM, Choo SAS, Smith JF & Lishko P V. (2013) Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* **2**: 1–19
- Mansell SA, Publicover SJ, Barratt CLR & Wilson SM (2014) Patch clamp studies of human

- sperm under physiological ionic conditions reveal three functionally and pharmacologically distinct cation channels. *Mol. Hum. Reprod.* **20**: 392–408
- Martins Da Silva SJ, Brown SG, Sutton K, King L V., Ruso H, Gray DW, Wyatt PG, Kelly MC, Barratt CLR & Hope AG (2017) Drug discovery for male subfertility using high-throughput screening: A new approach to an unsolved problem. *Hum. Reprod.* **32**: 974–984
- Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y & Lishko P V (2016) Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science (80-.)*. **352**: 555–559
- Miller MR, Mansell SA, Meyers SA & Lishko P V. (2015) Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium* **58**: 105–113 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.009>
- Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ & Clapham DE (2008) Ion Channels that Control Fertility in Mammalian Spermatozoa. *Int J Dev Biol* **52**: 607–613
- Neher E & Sakmann B (1992) The Patch Clamp Technique. *Sci. Am.* **266**: 44–51 Available at: <http://www.scientificamerican.com/article/the-patch-clamp-technique/>
- Neri E, Bénard M & Alagón A (2014) Reptiles venenosos en México. *Rev. Digit. Univ.* **15**: 1–8
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A & Giraldo C (2006) El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* **19**: 426–436
- Pérez-Ortega JE & Picones A (2016) DRUGSEARCHWARE.
- Picones A (2015) Ion Channels as Medicinal Targets of Biological Toxins: The Impact of Automated Patch-Clamp Electrophysiology. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**: 631–637 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25751269> <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=15&issue=7&spage=631>
- Picones A, Loza-Huerta A, Segura-Chama P & Lara-Figueroa CO (2016) Contribution of Automated Technologies to Ion Channel Drug Discovery. En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* pp 357–378.
- Publicover S, Harper C V & Barratt C (2007) [Ca²⁺]_i signalling in sperm-making the most of what you've got. *Nat. Cell Biol.* **9**: 235–242
- Ren D & Xia J (2010) Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology* **25**: 165–175 Available at: <http://physiologyonline.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiol.00049.2009>
- Reptiles | Biodiversidad Mexicana Available at: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/animales/reptiles/reptiles.html [Consultado enero 18, 2018]
- Rojas S, Perez Ramos J & Rico Rocillo G (2009) Quimiotaxis y enfermedad. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* **47**: 51–56 Available at: <http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:3628/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=f9e923f1-8e1d-425b-a826-339bb6c77c5e@sessionmgr4002&hid=4206>
- Sampedro A, de los Toyos JR & Martínez-Nistal A (1995) Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría

- Sánchez-Cárdenas C, Servín-Vences MR, José O, Treviño CL, Hernández-Cruz A & Darszon A (2014) Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biol. Reprod.* **91**: 1–13 Available at: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.119768>
- Sánchez-Carranza O, Torres-Rodríguez P, Darszon A, Treviño CL & López-González I (2015) Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**: 554–559
- Sarabia L & Munuce MJ (2011) Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Rev. Med. Chil.* **139**: 548–549
- Schaefer M, Hofmann T, Schultz G & Gudermann T (1998) A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 3008–3013 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Seshata (2013) Principios básicos sobre ciencia cannabinoide: ¿Qué es el 2-AG? Available at: <https://sensiseeds.com/es/blog/principios-basicos-sobre-ciencia-cannabinoide-que-es-el-2-ag/> [Consultado marzo 6, 2018]
- Singh AP & Rajender S (2015) CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod. Biomed. Online* **30**: 28–38
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R & Kaupp UB (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**: 382–386 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09769>
- Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W & Giojalas LC (2006) Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* **86**: 745–749
- Turner RM (2006) Moving to the beat : a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**: 25–38
- Vacquier VD (1998) Evolution of gamete recognition proteins. *Science (80-.)*. **281**: 1995–1998 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748153> [Consultado enero 17, 2018]
- WHO (2010) WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
- Zhang J, Chung TDY & Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**: 67–73 Available at: <http://jbx.sagepub.com/content/4/2/67.short>