



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE POSGRADO

“LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE ZINC ZNT3  
Y ZIP3 EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS DE RATÓN”

## **T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR**  
QUE PRESENTA:

LIC. KARLA LISETTE ANDRADE LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JULIO CÉSAR CHÁVEZ ZAMORA

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO 30 DE MAYO DEL 2018

## **Lugar y fecha de la realización de la tesis.**

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, durante el periodo comprendido de enero de 2016 a diciembre del 2017.

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Dr. Julio César Chávez Zamora

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Dr. Luis Enrique Cañedo Dorantes

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay

Miembros del Comité Revisor de Tesis:

Presidente: Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Secretario: Dr. Luis Enrique Cañedo Dorantes

Primer vocal: Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Segundo vocal: Dr. Julio César Chávez Zamora

Tercer vocal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

## Financiamiento

Esta tesis fue financiada por:

- DGAPA/UNAM: IN204914 para ILG, IN203116 para CT.
- Programa de Posgrado en Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UAEM.
- Beca por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, a mis papás y hermanos porque siempre han estado a mi lado en mi crecimiento personal y académico, gracias a sus valores y educación es como he aprendido a confiar en la vida, elegir lo que me gusta hacer y escoger lo mejor para mí. Siempre me han apoyado cuando más los necesito, sea cual sea la situación, es por eso que les agradezco con todo el corazón lo que han hecho por mis hermanos y por mí.

Quiero agradecer al posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, cuando leí su perfil de ingreso y egreso, objetivos y líneas de investigación, supe que era el camino para mí, para mi crecimiento académico, ya que en un futuro quiero tener mi grupo de investigación.

También quiero agradecer al Dr. Julio César Chávez Zamora, quien es un excelente investigador y padre de familia, así como un gran tutor, por ser mi guía durante esta etapa de mi vida, la cual es muy importante para mí, gracias a sus conocimientos y habilidades que hicieron posible el desarrollo de mi proyecto de maestría, gracias por tenerme paciencia y explicarme paso a paso cuando algo se me dificultaba. Al Dr. Juan José Acevedo Hernández, por haber sido mi co-tutor y profesor durante la maestría, gracias por sus consejos que me ayudaron a reflexionar sobre la vida académica, y por su gran ayuda en corrección de estilo en mi tesis. A mi amiga Paulina Torres por brindarme su amistad y haber estado siempre al tanto de qué era lo que necesitaba para mis experimentos. A mi amigo César por haberme apoyado durante este proceso y aconsejarme en diversas situaciones en las cuales me encontré en esta etapa.

Quiero agradecer al Dr. Ignacio López, por su apoyo académico y económico para que este proyecto se llevara a cabo.

Quiero agradecer a la Dra. Claudia Treviño, por siempre tener empatía con los estudiantes, por apoyarme en las situaciones difíciles, y por aconsejarme.

Quiero agradecer a mi comité de seminarios de investigación, a la Dra. Claudia Treviño, al Dr. Julio Chávez, al Dr. Juan Acevedo, al Dr. Luis Cañedo, al Dr. Santa Olalla y al Dr. Carlos Muñoz, gracias por sus consejos en cada Seminario, realmente ayudaron para seguir desarrollando mi proyecto de manera proactiva.

A los técnicos del laboratorio, el Lic. José Luis de la Vega Beltrán y a la Mtra. Paulina Torres.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>Reproducción</b> .....	2
<b>Fecundación</b> .....	4
<b>Morfología del espermatozoide</b> .....	5
<b>Activación de la Movilidad y Capacitación</b> .....	6
<b>Reacción Acrosomal</b> .....	8
<b>Espermatogénesis</b> .....	9
<b>Zinc (Zn<sup>2+</sup>)</b> .....	12
<b>Interacción del zinc con las proteínas</b> .....	13
<b>Transporte de zinc</b> .....	19
<b>Transportadores de la familia ZnT (Slc30) y Zip (Slc39)</b> .....	19
<b>Otras maneras de transportar zinc</b> .....	24
<b>ANTECEDENTES</b> .....	25
<b>Planteamiento del problema</b> .....	28
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>General</b> .....	29
<b>Particulares</b> .....	29
<b>HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>Animales</b> .....	31
<b>Obtención de células espermatogénicas y espermatozoides</b> .....	31
<b>Medición de flujo de zinc</b> .....	32
<b>Inmunocitoquímica en laminilla</b> .....	33
<b>Inmunocitoquímica por microscopía de flujo (AMNIS)</b> .....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>Identificación de diferentes poblaciones de células espermatogénicas de ratón</b> .....	35
<b>Medición del flujo de zinc por célula única y microscopía de flujo</b> .....	37
<b>Identificación del transportador ZnT3 y Zip3 en células espermatogénicas y espermatozoides</b> .....	43
<b>DISCUSIÓN</b> .....	52
<b>CONCLUSIONES</b> .....	55

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56
<b>ABREVIATURAS</b> .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de reproducción asexual. ....	3
Figura 2. Imagen representativa de la estructura de un espermatozoide de humano. ....	5
Figura 3. Diagrama de la vía de activación cAMP.....	7
Figura 4. Espermatogénesis.....	9
Figura 5. Diagrama de testículo de ratón. ....	11
Figura 6. Interacción del zinc con proteínas.....	14
Figura 7. Interacciones del zinc con los aminoácidos de las proteínas. ....	15
Figura 8. Interacciones funcionales del zinc. ....	16
Figura 9. Interacción de uno o más iones zinc con las proteínas. ....	17
Figura 10. Localización y función de los transportadores de zinc. ....	20
Figura 11. Topografía del transportador ZnT.....	21
Figura 12. Topografía del transportador Zip.....	22
Figura 13. Distribución del zinc en los órganos.....	23
Figura 14. Expresión de los transportadores de zinc en células espermatogénicas de rata. ....	25
Figura 15. Transporte de zinc en células espermatogénicas de rata. ....	26
Figura 16. Obtención de poblaciones de células espermatogénicas de ratón.....	36
Figura 17. El NaHCO <sub>3</sub> incrementa la concentración de Zinc intracelular en células espermatogénicas de ratón. ....	39
Figura 18. La adición de ZnSO <sub>4</sub> no induce un incremento del zinc intracelular, incluso después de 45 minutos de incubación.....	40
Figura 19. El zinc intracelular no incrementa en las células espermatogénicas.....	42
Figura 20. Localización de los transportadores ZnT3 y Zip3 analizados mediante inmunocitoquímica.....	44
Figura 21. El transportador ZnT3 coincide con el desarrollo del acrosoma en células espermatogénicas de ratón. ....	46
Figura 22. El transportador ZnT3 se encuentra en la región del acrosoma de espermatozoides de ratón.....	48
Figura 23. El transportador de zinc ZnT3 pero no Zip3 se expresa en diferentes poblaciones de células espermatogénicas de ratón. ....	49
Figura 24. El transportador de zinc ZnT3 pero no Zip3 se expresa en espermatozoides maduros de ratón.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales de las células espermatogénicas. ....	10
Tabla 2. Valores de afinidad de enzimas por el ion zinc.....	18
Tabla 3. Expresión de algunos transportadores de zinc de muestras humanas. ....	27

## RESUMEN

En el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, la célula modelo es el espermatozoide, y los procesos que le dan origen. La espermatogénesis comprende el desarrollo del espermatozoide a partir de una célula madre que sufre mitosis, meiosis y diferenciación celular hasta llegar a producir cuatro espermatozoides. Mediante trabajos realizados anteriormente se le ha dado gran importancia al ion zinc durante la espermatogénesis, por ello el zinc debe estar altamente regulado, ya que una disminución puede limitar el desarrollo de las células espermatogénicas y en exceso puede ser tóxico. El zinc tiene diferentes funciones dentro de las células, como por ejemplo se ha identificado que participa en el crecimiento y desarrollo celular, es cofactor de las metaloenzimas, y forma parte estructural de proteínas.

En la homeostasis de zinc participan los transportadores de zinc de las familias Zip y ZnT. Los miembros de la familia Zip contribuyen al incremento del zinc intracelular, mientras que los miembros de la familia ZnT son responsables de sacar zinc al medio extracelular o a meter zinc dentro de organelos, generando una disminución de zinc intracelular.

El zinc tiene diferentes funciones dentro de las células, como por ejemplo se ha identificado que participa en el crecimiento y desarrollo celular, es cofactor de las metaloenzimas, y forma parte estructural de proteínas.

En este trabajo se hizo la detección de los transportadores de zinc en células espermatogénicas de ratón. Se hizo la detección de diferentes poblaciones celulares mediante la comparación por contenido de ADN. Adicionalmente analizamos la presencia de ZnT3 y Zip3 en células espermatogénicas de ratones CD1 de aproximadamente 80 días de nacidos. Para ello utilizamos anticuerpos específicos para ZnT3 y Zip3. También analizamos los flujos de zinc mediante la incubación de las células espermatogénicas con el colorante sensible a zinc llamado FluoZin1-AM, con la finalidad de observar si hay un incremento o disminución de zinc intracelular al poner en contacto a las células con diferentes medios.

Los experimentos de inmunocitoquímica nos permitieron detectar al transportador ZnT3 en la región del acrosoma, lo cual es muy interesante, ya que se observa desde la biogénesis del acrosoma hasta los espermatozoides maduros.

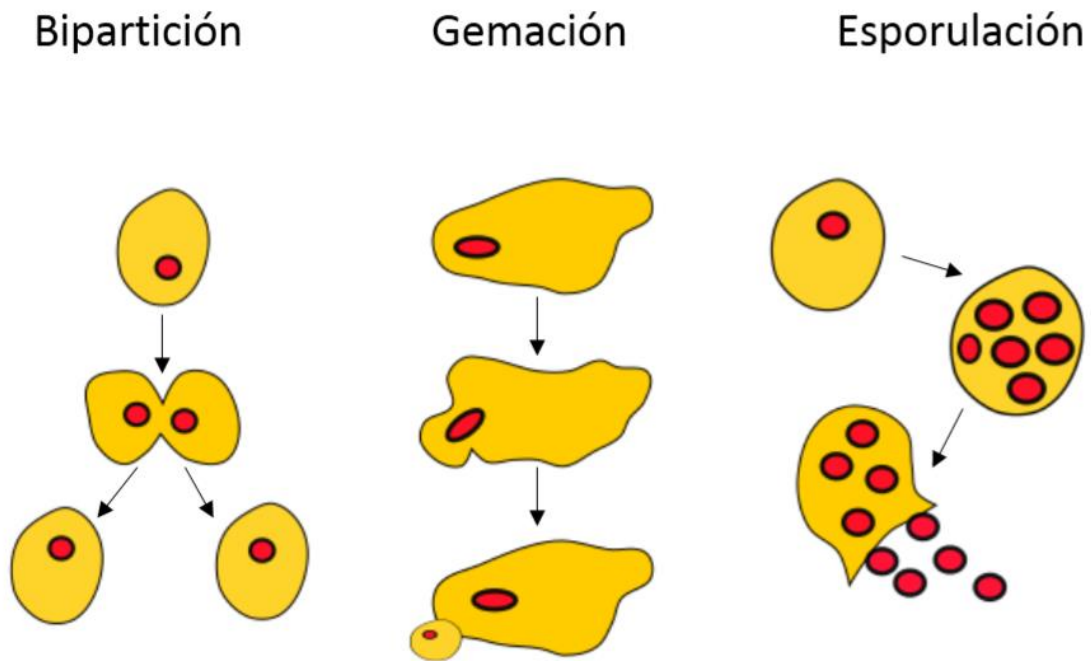


## **INTRODUCCIÓN**

En el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide se generan proyectos de alto impacto científico en torno al desarrollo celular y caracterización de moléculas que se encuentran en los espermatozoides, principalmente de erizos de mar, ratones y humanos. De esta manera, se pretende conocer los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de diferenciación: espermatogénesis y espermiogénesis, así como en los eventos fisiológicos del espermatozoide: movilidad, hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal, los cuales son indispensables para llevar a cabo el reconocimiento y fusión con el gameto femenino. La fusión del espermatozoide con el óvulo se denomina fecundación, y es el evento clave en la generación de un nuevo individuo por medio de la reproducción sexual.

## **Reproducción**

La reproducción es un fenómeno que se caracteriza por la creación de nuevos organismos, este proceso puede ser de dos tipos, 1) reproducción sexual y 2) reproducción asexual. En la reproducción sexual hay una combinación de los genomas del macho y la hembra, lo cual ocurre durante la fusión del gameto masculino y femenino. Se sabe que los genes que regulan la reproducción sexual, como los que tienen un papel en el reconocimiento de los gametos divergen rápidamente, como resultado de una evolución adaptativa, la consecuencia de esto es generar barreras en la fecundación que puedan llevar a la especiación (1). Mientras que la reproducción asexual da lugar a una descendencia que es idéntica al progenitor, y hay tres tipos de reproducción asexual: bipartición, gemación y esporulación (Figura 1). La bipartición se caracteriza por la división de un organismo en dos, cada una de estas da origen a un nuevo organismo. La esporulación se da en los hongos y algunas plantas, se refiere a la formación de esporas que pueden ser transportadas en el aire, así es como se propagan y generan nuevos organismos. La gemación se caracteriza en que el nuevo organismo crece sobre el organismo adulto, y una vez obtiene los nutrientes necesarios se desprende del organismo adulto (2).



*Figura 1. Tipos de reproducción asexual.*

En esta imagen se muestra los tres diferentes tipos de reproducción asexual, que son: bipartición, gemación y esporulación (3).

Cada uno de los tipos de reproducción tiene ventajas que han permitido su permanencia a lo largo de la historia. En la reproducción asexual sólo hace falta un progenitor y se pueden generar una gran cantidad de descendientes en poco tiempo, sin embargo, las especies presentan poca variabilidad genética y por ello podrían ser muy sensibles a los cambios ambientales. Los descendientes generados son idénticos, ya que proceden de un mismo organismo y tienen ADN idéntico.

Por su parte, en la reproducción sexual la descendencia es muy diversa, ya que los individuos proceden de la combinación del ADN de dos individuos distintos. Esta diversidad podría facilitar la adaptación de la especie ante los cambios ambientales. Para ello, hace falta el entendimiento de dos progenitores, lo cual puede requerir tiempo para que los dos individuos puedan encontrarse y aparearse, así como destinar recursos y energías a la formación de la descendencia. Incluso a nivel celular, los gametos deben encontrarse, entablar la comunicación y reconocimiento molecular antes de fusionarse y acoplar sus genomas

haploides. Así, mediante la fecundación del óvulo por el espermatozoide, el nuevo individuo termina con un genoma diploide, diferente al de sus progenitores.

## **Fecundación**

La fecundación es un evento de gran importancia en la biología de la reproducción, cuya función principal es generar diversidad genética y un nuevo organismo. La fecundación se lleva a cabo cuando el gameto masculino (espermatozoide) sufre cambios morfofisiológicos y bioquímicos para después fusionarse con el gameto femenino (óvulo) generando un cigoto, esto se da únicamente en organismos que se reproducen de manera sexual (4).

Los espermatozoides pueden vivir meses en los testículos finalizado el proceso de espermatogénesis, y una vez depositados en el tracto reproductor femenino dependiendo la especie pueden sobrevivir por un tiempo (5).

El transporte de los espermatozoides hasta llegar al sitio de fecundación empieza cuando el semen es depositado en el tracto reproductor femenino, ahí se van a encontrar con el moco cervical, que sirve como filtro para separar a los espermatozoides con una movilidad adecuada de los que no la tienen. Otro factor que ayuda al transporte de los espermatozoides son las contracciones musculares. Los espermatozoides se guardan en un reservorio, donde interactúan con el epitelio del oviducto, y ahí esperan en lo que se genera la ovulación (6).

Los espermatozoides son células que son identificadas como extrañas por el tracto genital femenino, lo cual ocasiona que se encuentren con el sistema inmune de la hembra. En humanos y conejos se ha visto que la inseminación vaginal estimula la migración de leucocitos, principalmente neutrófilos y macrófilos. Sin embargo esta respuesta inmune no es una barrera para los espermatozoides (6).

Una vez que el espermatozoide llega al lugar de fecundación (ámpula) interacciona con las células del cumulus que rodean al ovocito, posteriormente el espermatozoide se adhiere a la zona pelúcida (ZP) y la penetra hasta llegar al ovocito, donde ocurre la fusión de ambos gametos (5).

## Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides de cualquier mamífero se caracterizan por tener cabeza y flagelo, como se muestra en la Figura 2. En la cabeza se encuentra el núcleo (en donde el ADN está compactado), la envoltura nuclear redundante y el acrosoma, que es una vesícula derivada del aparato de Golgi que contiene enzimas hidrolíticas y que ayudan al espermatozoide a fusionarse con el óvulo (4)(7). A lo largo del flagelo se encuentra el axonema, que es el motor para el batido flagelar mediante la hidrólisis de ATP. También se muestra la división del flagelo en tres partes: la primera es la pieza media (círculos morados), en donde se encuentran las mitocondrias, la segunda es la pieza principal (círculos naranjas) y la tercera es la pieza terminal (círculos rojos) (4).

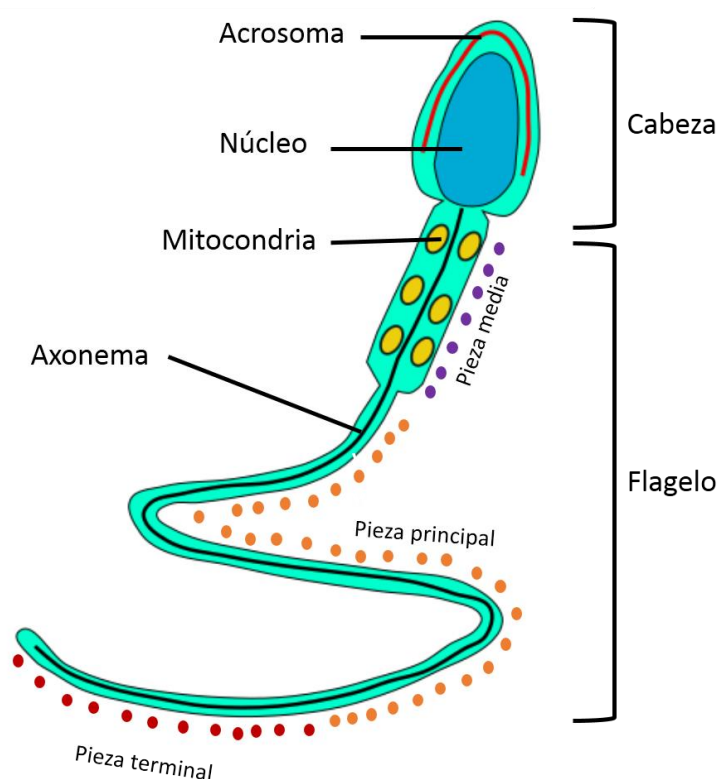


Figura 2. Imagen representativa de la estructura de un espermatozoide de humano.

El espermatozoide está conformado por cabeza y flagelo. En la cabeza se encuentra el núcleo y el acrosoma. El axonema se encuentra a lo largo del flagelo y en la pieza media de encuentran las mitocondrias. Divisiones del flagelo: pieza media (círculos morados), pieza principal (círculos naranjas) y pieza terminal (círculos rojos).

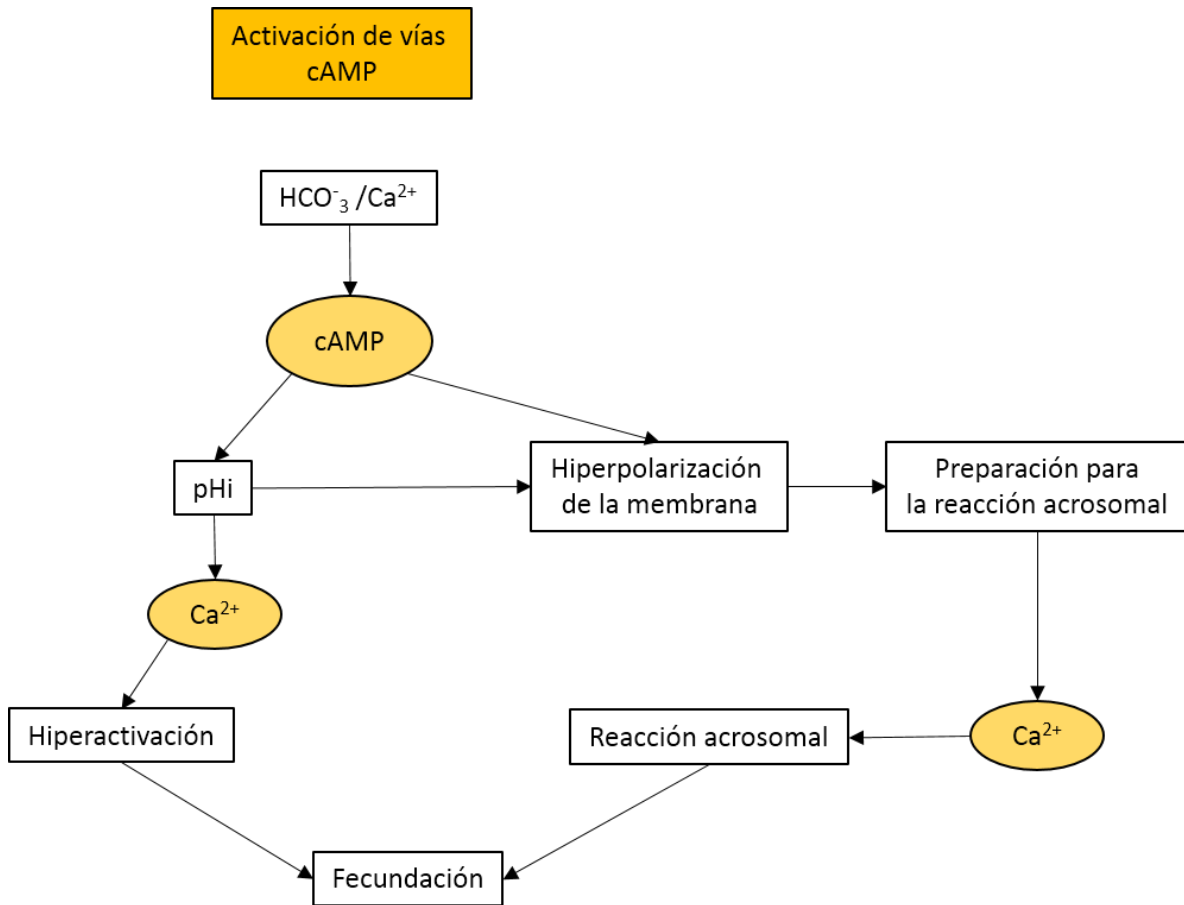
## **Activación de la Movilidad y Capacitación**

Cuando los espermatozoides están en el epidídimo su pH es ácido ~ 6.8, y no se mueven. Sin embargo, al ser depositados en el tracto reproductor femenino adquieren un pH citoplasmático alcalino y tienen poca movilidad. De acuerdo a Austin y Chang (1951), para que el espermatozoide sea capaz de fecundar al óvulo debe pasar por un proceso llamado capacitación (8).

La capacitación se caracteriza por la remoción de glucoproteínas adquiridas en el epidídimo, remoción de proteínas adherentes del plasma seminal y remoción de colesterol. También durante la capacitación incrementa intracelularmente el  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH y adenosina monofosfato cíclico (cAMP) y proteínas de la membrana del espermatozoide se fosforilan en residuos tirosina (4), y hay una hiperpolarización de la membrana plasmática (9) (10), como se muestra en la Figura 3.

Durante la capacitación, el espermatozoide pasa de una movilidad activada a una hiperactivada, que se caracteriza por un incremento del ángulo del batido flagelar, que genera movimientos asimétricos y un nado más vigoroso (4).

Durante este proceso (capacitación), el papel del canal de  $\text{K}^+$  SLO 3 y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  CatSper son muy importantes, ambos se activan por una alcalinización intracelular y son voltaje dependiente. Los ratones mutantes nulos para estos canales tienen problemas de infertilidad (9)(11)(12).



Modificado de: Gervasi *et al.*, 2016.

Figura 3. Diagrama de la vía de activación cAMP.

La activación de la vía cAMP se da por la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , estos iones activan la vía cAMP, lo cual genera que haya un incremento del pHi y se genera una hiperpolarización de la membrana plasmática. El incremento del pHi activa algunos canales que meten  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  genera la hiperactivación lo cual induce la fecundación. La hiperpolarización de la membrana plasmática también participa en la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual genera un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  e induce a la reacción acrosomal lo cual finaliza en la fecundación.

## **Reacción Acrosomal**

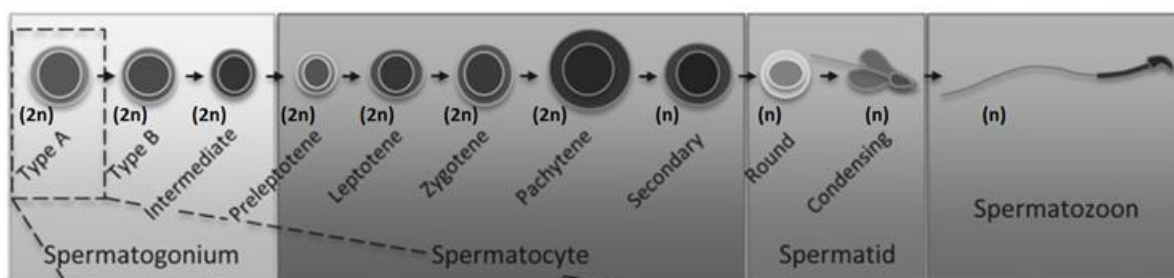
La reacción acrosomal (RA) juega un papel muy importante en el proceso de fecundación, que se caracteriza por la liberación de enzimas hidrolíticas del acrosoma (13), así como también involucra la apertura de poros de fusión que ayuda a la liberación de vesículas híbridas. Un evento crucial es el cambio de la topología de la cabeza, ya que se expone la membrana interna del acrosoma.

Debido a que el zinc juega un papel importante en la fisiología del espermatozoide, se debe mencionar que recientemente se ha estudiado el papel del zinc durante la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de bovino (14). En dicho estudio, los autores encontraron que el receptor de zinc (GPCR), activa una adenilato ciclasa transmembranal (tmAC), proteína cinasa A (PKA) y tirosina cinasa (Src), los cuales son elementos fundamentales para que se lleve a cabo la capacitación.

El zinc induce fosforilación de proteínas activando PKA, y de manera interesante el inhibidor de PKA (H-89) inhibe la fosforilación de EGFR (factor de crecimiento epidermal) y PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), los cuales son muy importante para que se lleve a cabo la RA. Para corroborar la importancia de zinc en la RA, mediante la activación de sAC y/o tmAC, usaron inhibidores como 2-OH-estradiol (2-OH) para sAC y ddAdo para tmAC. Con 2-OH, se reduce la RA mediada por zinc hasta un 60 %, mientras que con ddAdo la reducción de la RA es del 100%. También reportan que bajas concentraciones de zinc extracelular durante la capacitación de los espermatozoides pueden activar a la PKA, Src, EGFR y PI3K. De manera interesante se han hecho estudios donde muestran que el zinc es capaz de inducir la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados, incluso en ausencia de calcio extracelular (14). A pesar de todo lo anterior, los estudios hechos en modelos murinos hasta el momento son limitados. Por ello, en este proyecto nos enfocaremos a elucidar la localización de algunas moléculas que tienen un papel importante en el transporte del zinc, utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia en células espermatogénicas de ratón.

## Espermatogénesis

El espermatozoide se genera por un proceso llamado espermatogénesis, en donde a partir de una célula madre (espermatogonia) que es una célula diploide ( $2n$ ), se va a diferenciar hasta ser un espermatozoide maduro, pasando por diferentes poblaciones celulares. Las características de cada población se muestran en la Tabla 1 y Figura 4. Durante este proceso, la espermatogonia por divisiones meióticas se vuelve un espermatocito primario. Posteriormente después se genera la célula paquiteno, seguido de espermatocitos secundarios. A partir de este estadio ya serán células haploides ( $n$ ). Posteriormente, las células experimentan meiosis 2, en donde se dividen para generar las espermátidas, y a partir de esta población de células va a ocurrir un evento llamado espermiogénesis, que se caracteriza por condensación de la cromatina, pérdida del citoplasma, etc., hasta llegar a espermatozoide maduro. La espermiogénesis representa uno de los dos eventos de metamorfosis más importantes de la reproducción sexual, donde la espermátida redonda e inmóvil se convierte en un espermatozoide, alargado y altamente móvil (Figura 4). El segundo evento de metamorfosis ocurre después de la fecundación, cuando el óvulo fecundado genera el individuo completo que dio origen a los gametos.



Modificado de: T. García and M. - C. Hofmann, 2012

Figura 4. Espermatogénesis.

La célula madre llamada espermatogonia (tipo A) sufre mitosis y forma la espermatogonia tipo B e intermedia, la espermatogonia intermedia sufre meiosis I y forma al espermatocito primario (preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno, espermatocitos secundarios), el espermatocito secundario experimenta meiosis II y forma a la espermátida (redonda y condensante), y finalmente ocurre la diferenciación celular que da origen al espermatozoide.



Tabla 1. Características principales de las células espermatogénicas.

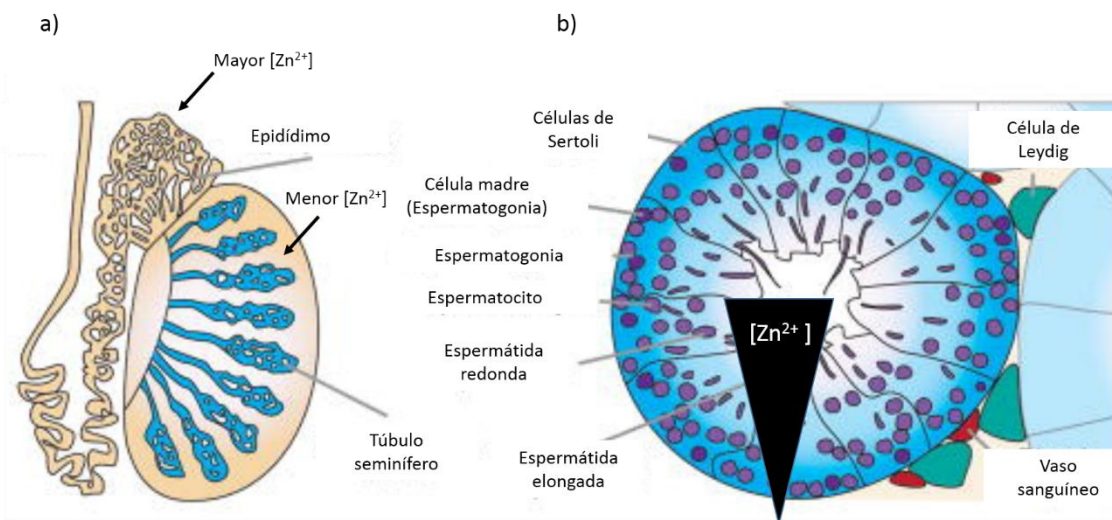
Tipo celular	Diámetro	Morfología	Contenido de ADN
<b>Espermatogonia</b>	8-10 $\mu\text{m}$	Esféricas	2n
<b>Espermatocitos (preleptoteno)</b>	7.6- 8.2 $\mu\text{m}$	Esféricas, poca granulosidad.	2n
<b>Espermatocitos (leptoteno y zigoteno)</b>	8.2- 12 $\mu\text{m}$	Esféricas, gránulos.	2n
<b>Espermatocitos (paquiteno)</b>	12-18 $\mu\text{m}$	Esféricas, gránulos.	2n
<b>Espermátida redonda</b>	8-10 $\mu\text{m}$	Esféricas, citoplasma claro, núcleo pequeño, nucléolo, inicia formación del acrosoma en el polo apical del núcleo.	n
<b>Espermátida condensante</b>	7-8 $\mu\text{m}$	Asimétrica, empieza la condensación, formación del acrosoma sobre el núcleo, y hay protuberancias de la membrana celular.	n

Modificado de: Bellvé *et al.*, 1979.

De manera interesante, la concentración de zinc en los testículos es relativamente baja. En hombres adultos se ha detectado una concentración de zinc en peso seco de ~20-200  $\mu\text{g/g}$ , y en la próstata de ~800-3000  $\mu\text{g/g}$ . El zinc incrementa en relación a la migración de los espermatozoides durante su desarrollo, hasta alcanzar en el epidídimo una concentración casi 100 veces mayor respecto a testículo, como se muestra en la Figura 5. De hecho, en el plasma

seminal el zinc alcanza una concentración de aproximadamente 1 mM. Algunos de los beneficios del zinc son: 1) promueve la maduración de células germinales hasta convertirse en espermatozoides, 2) prolonga el tiempo de vida de los espermatozoides una vez liberado en el tracto reproductor femenino (15), 3) estabiliza la membrana celular y del ADN (16), 4) incrementa la movilidad del espermatozoide (17).

Además, se ha observado en ratas que la deficiencia de zinc genera atrofia testicular, pérdida de células germinales (espermatogonia tipo A y B, espermatocitos, espermátidas), detiene el proceso de espermatogénesis, e incrementa la muerte de las células espermatogénicas por apoptosis (18)(15). En humano, la deficiencia de zinc causa hipogonadismo, disminución del volumen de los testículos, atrofia de los túbulos seminíferos, y hace a las células susceptible a tener daño oxidativo (19). En ratón la deficiencia de zinc genera atrofia o un mal crecimiento de los testículos, así como una disrupción del proceso de la espermatogénesis (20). Adicionalmente, se ha visto por estudios de meta-análisis que en el plasma seminal de los hombres infértiles hay una menor concentración de zinc que en los hombres fértiles (21).



Modificado de: Kaitlin M. Laws *et al.*, 2017.

Figura 5. Diagrama de testículo de ratón.

Panel a) Testículo y epidídimo, en donde se indica con flechas que hay mayor concentración de zinc en el epidídimo respecto al testículo. b) Corte transversal de un túbulo seminífero de testículo, mostrando las diferentes poblaciones de células espermatogénicas. Conforme se va desarrollando la espermatogénesis hay un incremento de zinc, siendo los espermatozoides las células con más zinc.

Durante la espermatogénesis, el zinc forma enlaces SH-Zn-SH con las protaminas, lo cual favorece la condensación de la cromatina, para proteger y evitar el daño del ADN (22). Además, el zinc parece tener una participación importante para conservar la quiescencia de los espermatozoides maduros, ya que este ion es un bloqueador del canal Hv1 (en humanos). Se sabe que en el epidídimo los espermatozoides deben mantener una movilidad relativamente baja para evitar la pérdida de energía, y conservarla para cuando se requiere, que es durante su migración hacia el óvulo dentro del tracto reproductor femenino. Se ha reportado que lo que se necesita para pasar de un estado quiescente a una movilidad activada es un incremento de pH intracelular ( $pH_i$ ) (por el canal Hv1), así como un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  (por el canal CatSper). Ya que el zinc es un potente bloqueador del canal Hv1, ocasiona que no haya un incremento de  $pH_i$ , lo cual no permitirá la activación del canal CatSper, y por lo tanto no hay activación de la movilidad (23). De hecho, se sabe que en el tracto reproductor femenino la concentración de zinc disminuye significativamente, en relación a la concentración de zinc en el epidídimo.

### **Zinc ( $Zn^{2+}$ )**

Los metales de transición como hierro, manganeso, cobre y zinc son muy importantes para llevar a cabo procesos redox, como la fijación de nitrógeno, fotosíntesis, respiración mitocondrial (24). La concentración de zinc intracelular está muy regulada, ya que una disminución o un exceso es perjudicial para la célula, porque puede tener efectos secundarios como desplegamiento de proteínas o agregación de proteínas (24). Si hay una elevada concentración de zinc intracelular se genera disfunción de la mitocondria, como el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (25).

El zinc actúa como ácido fuerte y la manera en que las proteínas seleccionan al ion zinc es por un cambio rápido de ligando y la flexibilidad estereoquímica (24).

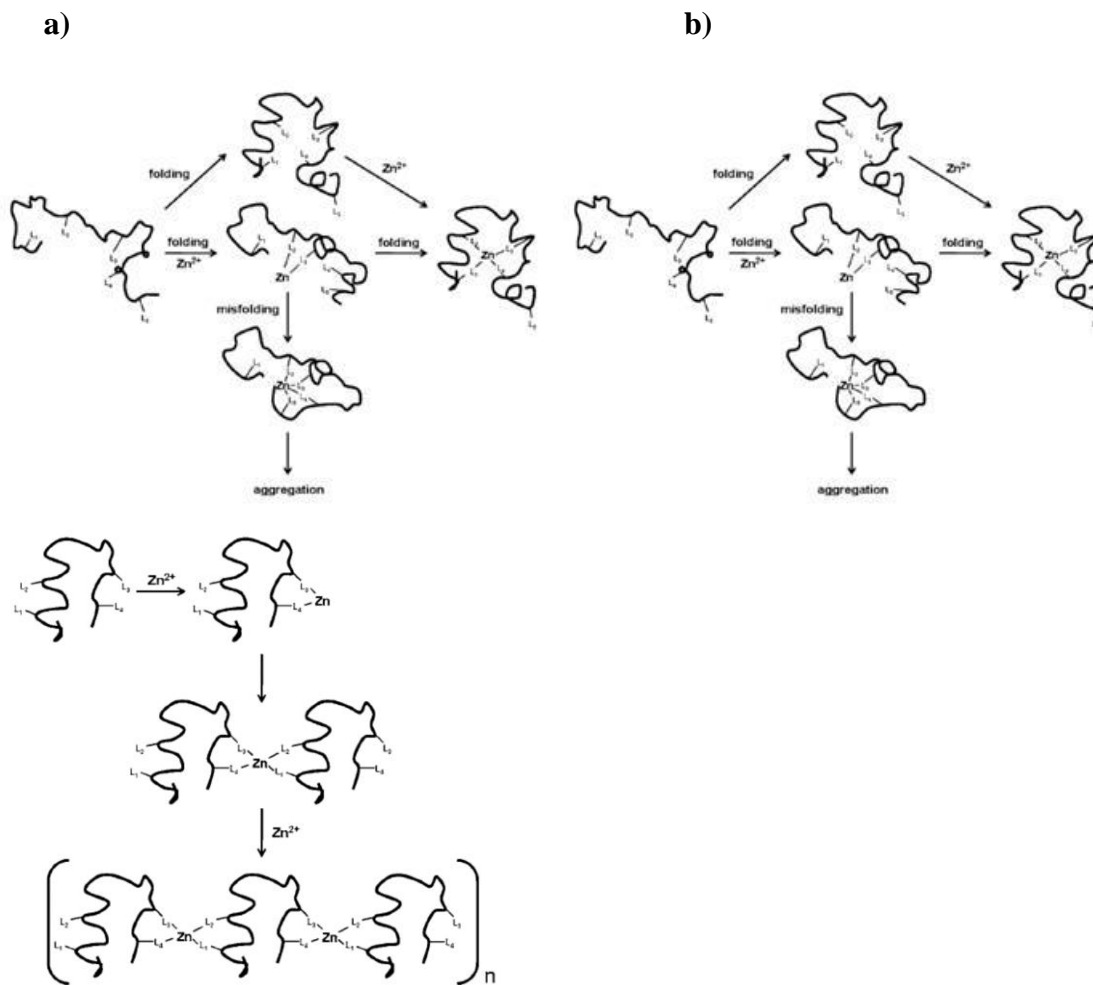
El mecanismo de cómo se mueve el zinc del espacio intracelular al extracelular o viceversa se desconoce. Sin embargo, se sabe que la concentración total dentro de las células está en el

rango de  $\sim 200 \mu\text{M}$ , pero se sabe que muchas proteínas utilizan zinc, dejando una concentración de zinc libre mucho menor. En eucariotas, en músculo esquelético de conejo la concentración de Zinc es de cientos de pM (picomolar), 24 pM en eritrocitos y 500 pM en células del neuroblastoma (24).

En el humano del 4% al 10% de los genes codifican proteínas que utilizan el zinc ya sea como cofactor, mantenimiento de la estructura, etc., estos porcentajes corresponden alrededor de 3,000 proteínas, de las cuales 397 son hidrolasas, 302 son ligasas, 167 son transferasas, 43 son oxidoreductasas, 24 son liasas/isomerasas, 957 factores de transcripción, 221 proteínas señalizadoras, 141 proteínas de transporte o almacenamiento, 53 proteínas con sitios estructurales de metal, 19 proteínas involucradas en la reparación de ADN, replicación y traducción, 427 dedos de zinc, y 456 proteínas de zinc con función desconocida (24).

### **Interacción del zinc con las proteínas**

Existen dos tipos de interacción de zinc con las proteínas, interacción intramolecular, significa que ayuda a formar la estructura de una sola proteína o interacción intermolecular, que significa que el zinc forma enlaces entre muchas proteínas, llegando a formar complejos proteicos muy grandes (Figura 6).

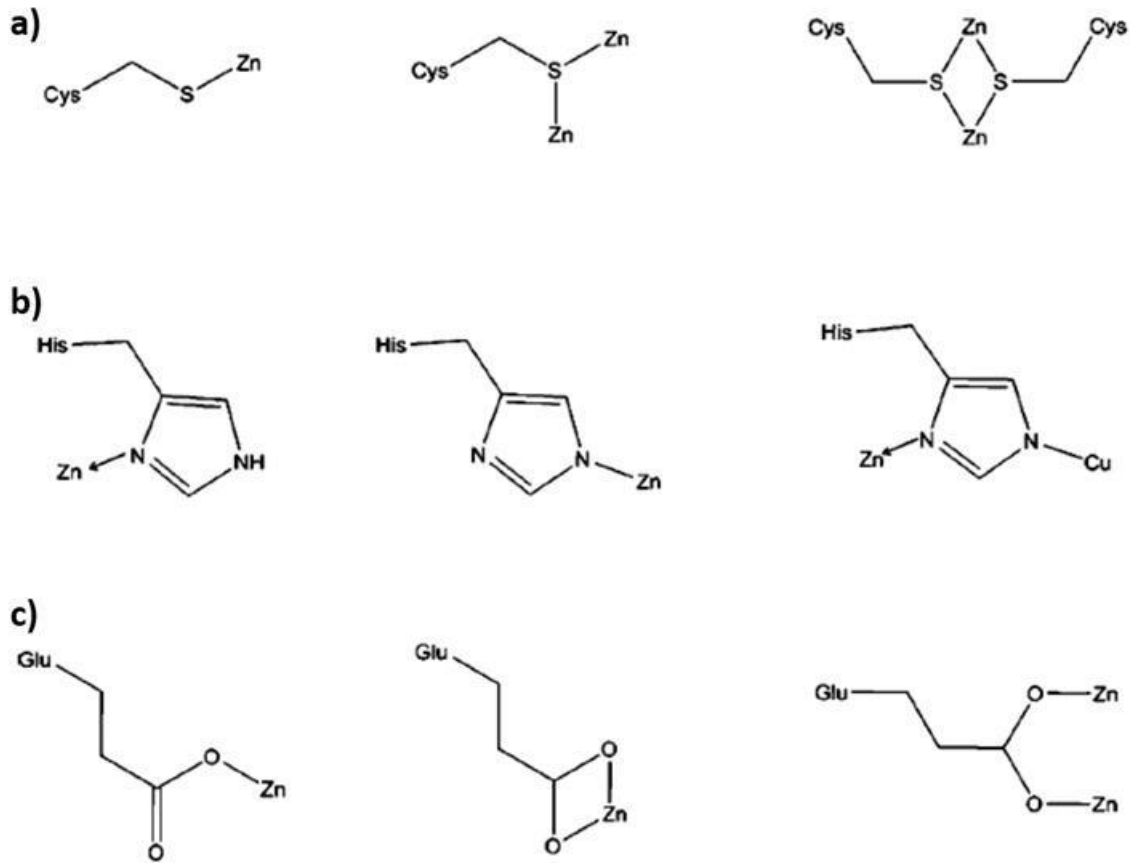


Maret *et al.*, 2009.

*Figura 6. Interacción del zinc con proteínas.*

Panel a) Interacción intramolecular entre el zinc y la proteína, la cual puede promover el plegamiento o desplegamiento de la proteína, pudiendo generar una agregación. b) la interacción intermolecular induce una agregación.

Los grupos de las proteínas que interactúan con el zinc son: el grupo imidazol de los nitrógenos de la histidina, el oxígeno del grupo carboxilato de glutamato o aspartato, y el sulfuro del grupo sulfidril del aminoácido cisteína (24). Las diferentes formas de interacción de los residuos de aminoácidos de las proteínas con el zinc se muestran en la Figura 7.

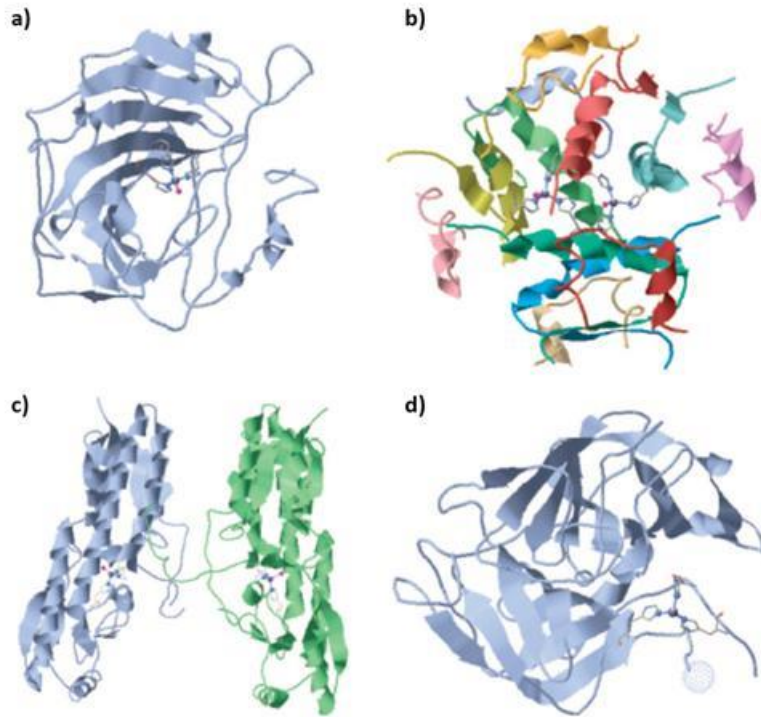


Maret *et al.*, 2009.

Figura 7. Interacciones del zinc con los aminoácidos de las proteínas.

Panel a) Interacción del Zn con el grupo sulfidril del aminoácido cisteína (Cys). b) Interacción del Zn con el grupo imidazol del nitrógeno de la histidina (His). c) Interacción del Zn con el oxígeno del glutamato (Glu) o también puede ser el aminoácido aspartato.

Los sitios de unión de zinc en las proteínas se han clasificado como catalítico y estructural. Se sabe que en la anhidrasa carbónica el zinc tiene una función catalítica, el cual se une a tres residuos histidinil. En el hexámero de la insulina tiene una función estructural, en la serina proteasa tiene una función inhibitoria y en el transportador ZnuA tiene una función de transportador, estas funciones se ilustran en la Figura 8.

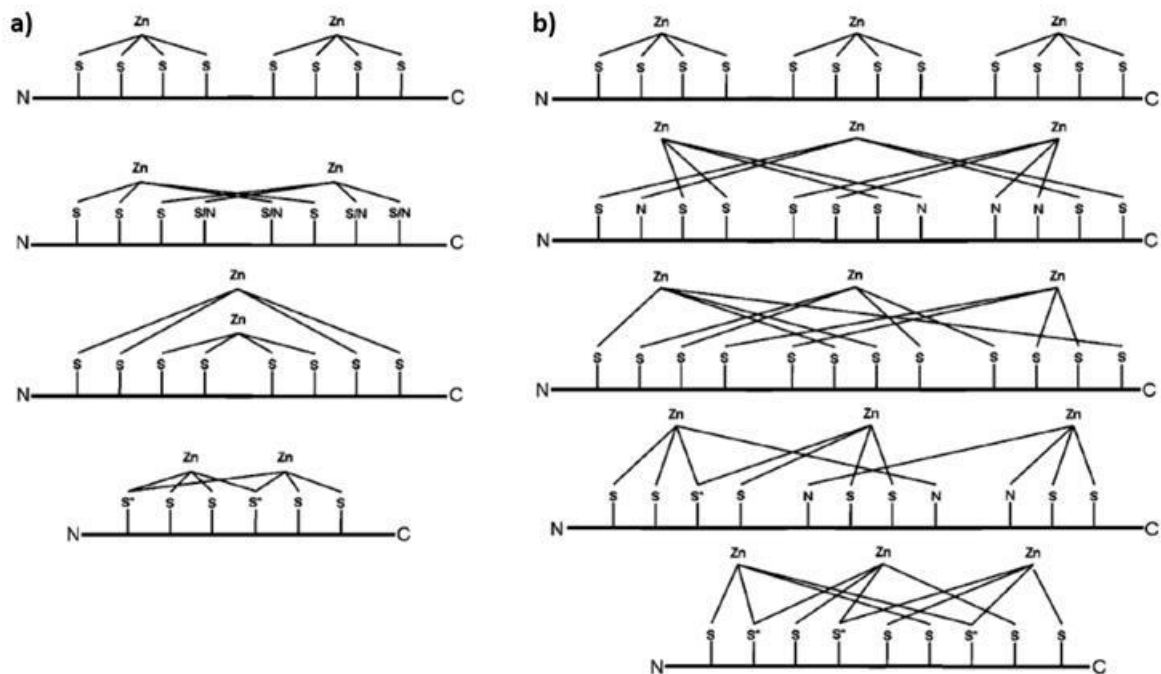


Modificado de Maret *et al.*, 2009.

*Figura 8. Interacciones funcionales del zinc.*

Panel a) Interacción del zinc con la anhidrasa carbónica II de humano. b) Interacción del zinc con el hexámero de insulina de humano. c) Interacción de zinc con el transportador ZnuA de *E. coli*. d) Interacción del ion zinc con la proteasa de serina de la glándula submaxilar de rata.

El zinc se organiza en pequeños dominios, aproximadamente de 20 aminoácidos, pero cuando se involucra dos o más iones zinc el dominio puede ser más grande, como se muestra en la Figura 9. La manera en cómo interactúa el zinc con el grupo sulfuro de las cisteínas tiene diferentes nombres, puede ser secuencial, no secuencial, y en clúster.



Modificado de Maret *et al.*, 2009.

Figura 9. Interacción de uno o más iones zinc con las proteínas.

Panel a) Interacción secuencial, no secuencial y de clúster de dos iones zinc. b) las mismas interacciones que en a), pero con tres iones zinc.

Las principales funciones del zinc son: catálisis, actividad inhibitoria, almacenamiento y empacamiento de proteínas, dimerización, formación de complejos proteínas/receptor, construcción de scaffolds y regulación (24).

También se sabe que el zinc tiene función inhibitoria, como por ejemplo el zinc tiene un papel inhibitorio en neurotransmisores afectando la corriente de GABA y Glicina (26). Existen dos maneras de inhibición, la primera puede ser que inhiba enzimas citosólicas, las cuales pueden ser inhibidas a concentraciones nanomolar o subnanomolar o por enzimas extracelulares que pueden ser inhibidas a concentraciones micromolar (24).

Por otro lado, existen diferentes quelantes de zinc, permeables y no permeables. Los quelantes permeables a la célula son: DEDTC (ácido dietildihioicarbámico) y TPEN (N,N,N',N'-tetrakis2-piridilmetileienediamina). Los quelantes no permeables a la célula, que quelan zinc extracelular son CaEDTA (a concentraciones altas ~10 mM) y tricina (N-(Tris(hidroximetil)metil)glicina) (26).



La afinidad de las proteínas con el zinc es muy importante, de hecho, las constantes de estabilidad varían mucho dependiendo a qué proteínas este unido el zinc, dado que podría ser parte esencial de la estructura de la proteína. A continuación, se muestra una tabla con los valores de afinidad de algunas enzimas por el ion zinc (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de afinidad de enzimas por el ion zinc.

Enzima	Coordinación	pKd	Condición
Fosfatasa alcalina ( <i>E.coli</i> )	Trinuclear	7.7, 10.2	pH 8.5, 1 M NaCl, 25 °C
Aminopeptidasa (A. <i>proteolítica</i> )	binuclear	9.8	pH 7.2, 0.1 M KCl, 5 mM Hepes, 6 °C
Enzima convertidora de angiotensina (pulmón de conejo)	N <sub>2</sub> O	8.2	pH 7.5, 0.3 M NaCl, 50 mM Hepes, 25 °C
Anhidrasa carbónica II (Humano)	N <sub>3</sub>	11.4	pH 7.0, 15 mM buffer fosfato, 30 °C
Carboxypeptidasa A (bovino)	N <sub>2</sub> O	10.5	pH 8.0, 1 M NaCl, 50 mM Tris, 4°C
Peptidasa dipeptidil III (hígado de rata)	N <sub>2</sub> O	12.3	pH 7.4, 50 mM buffer fosfato, 25°C
Aminopeptidasa de leucina (bovino)	binuclear	9-11	/
Fosfoglucomutasa (músculo de conejo)	No determinado	11.6	pH 8.5, 30°C
Sintasa de forfobilinógeno (eritrocitos de humano)	S <sub>3</sub>	Km=11.6	pH 8.5, 0 °C
Sonic hedgehog (humano)	N <sub>2</sub> O	<10	pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 mM Heper, 25 °C
Deshidrogenasa de sorbitol	NSO	11.2	pH 7.2. I= 0.02, 25 °C
Estromelisina (humano)	N <sub>3</sub>	10.7	/

Modificado de Maret *et al.*, 2009.

Proteínas de zinc con actividad redox tienen diferentes funciones, como por ejemplo controlar la actividad de chaperona, unión de proteínas con otras proteínas o ADN, actividades enzimáticas y censando el estrés disulfuro (24).

## **Transporte de zinc**

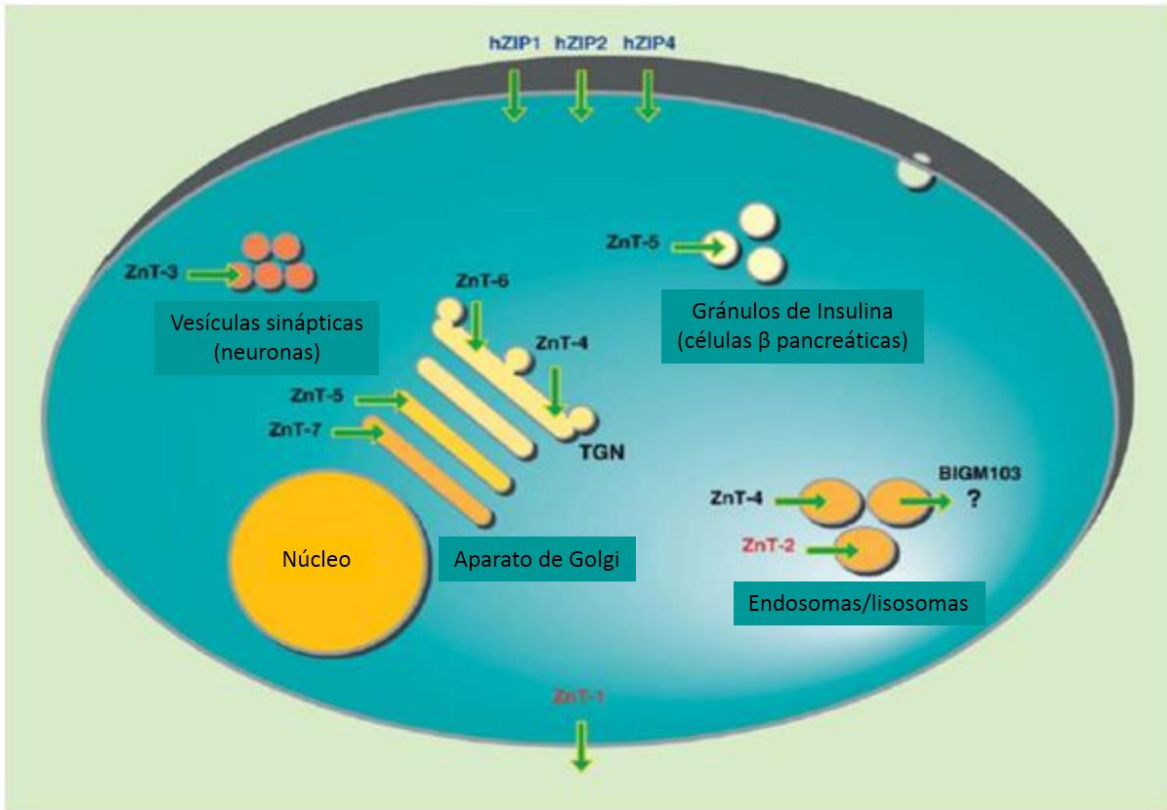
Hasta el momento no se cuenta con la estructura en 3D de transportadores de zinc de eucariotas. La información que se tiene sobre la estructura de transportadores de zinc corresponde de estudios hechos en procariotas (24).

Se han identificado varios sitios de unión de zinc en los transportadores, y la actividad de zinc depende de la disposición que hay de zinc en el microambiente. Algunos transportadores de zinc en procariotas son: ZntA (ATPasa tipo P), YjiP y CztB (facilitadores de difusión de cationes), el complejo ZnuABC (transportadores ABC dependientes de unión a proteínas).

La familia de facilitadores de difusión de cationes (CDF) en mamíferos son los ZnTs, en humanos hay 14 proteínas ZIP (Zrt/Irt-like) y 10 transportadores ZnT.

### **Transportadores de la familia ZnT (Slc30) y Zip (Slc39)**

Existen dos familias de transportadores de zinc de suma importancia para la homeostasis de zinc, la familia ZnT, codificados por el gen *Slc30* y la familia Zip, codificados por el gen *Slc39*. Ambas familias se pueden encontrar en la membrana plasmática o en organelos (27), como se muestra en la Figura 10.



Modificado de: T. Kambe *et al.*, 2003.

Figura 10. Localización y función de los transportadores de zinc.

Localización de los transportadores del Zn en organelos intracelulares y en la membrana plasmática, así como su función. La flecha indica hacia donde se mueve el ion zinc.

Los transportadores ZnT se encargan de la salida de zinc al medio extracelular y el transporte de zinc hacia organelos o vesículas, dejando menor concentración de éste metal en el citoplasma. Los ZnT funcionan como intercambiadores, el mecanismo de cómo se transporta zinc en la familia ZnT aún no se conoce bien, la estequiometría del intercambiador  $Zn^{2+} / H^{+}$  es de 1:1, es decir sacan 1 zinc y meten 1 protón (28)(29). Por otro lado, los transportadores Zip se encargan de transportar zinc al medio intracelular, ya sea del exterior de la célula o del interior de organelos internos, generando mayor concentración citoplasmática de zinc (30). Los Zip funcionan como cotransportadores  $Zn^{2+} / HCO_3^{-}$ .

Hasta el momento se han reportado diez miembros de la familia ZnT (*Slc30a1-Slc30a10*). Su estructura está conformada por seis segmentos transmembranales y una región rica en histidinas entre los segmentos IV y V. Esta región es la encargada de la unión a zinc. Las

regiones de amino y carboxilo terminal se encuentran en el medio intracelular (30) (Figura 11).

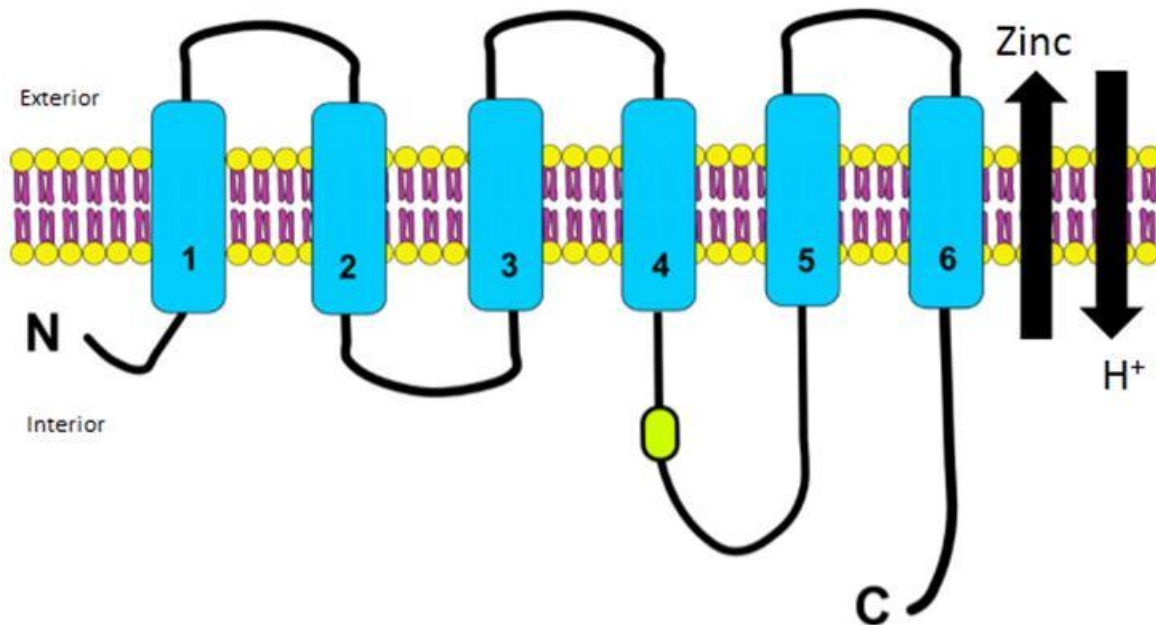


Figura 11. Topografía del transportador ZnT.

Los transportadores ZnT constan de seis segmentos transmembranales. Los ZnT actúan como antiportadores, ya que sacan zinc al medio extracelular y meten protones al interior de la célula.

La familia Zip (Zrt-,Irt-like protein) está conformada por 86 miembros, donde se han dividido en dos subfamilias, la subfamilia I (compuesto por secuencias de plantas y hongos) y la subfamilia II (compuesta por secuencias de insectos, nemátodos y mamíferos) (31). En mamíferos existen 14 miembros dependiendo la especie (*Slc39a1-Slc39a14*) (32). Estos transportadores están formados por ocho segmentos transmembranales, con un loop intracelular muy largo entre los segmentos III y IV, el cual tiene un dominio rico en histidinas, que puede servir como unión de zinc (30)(Figura 12).

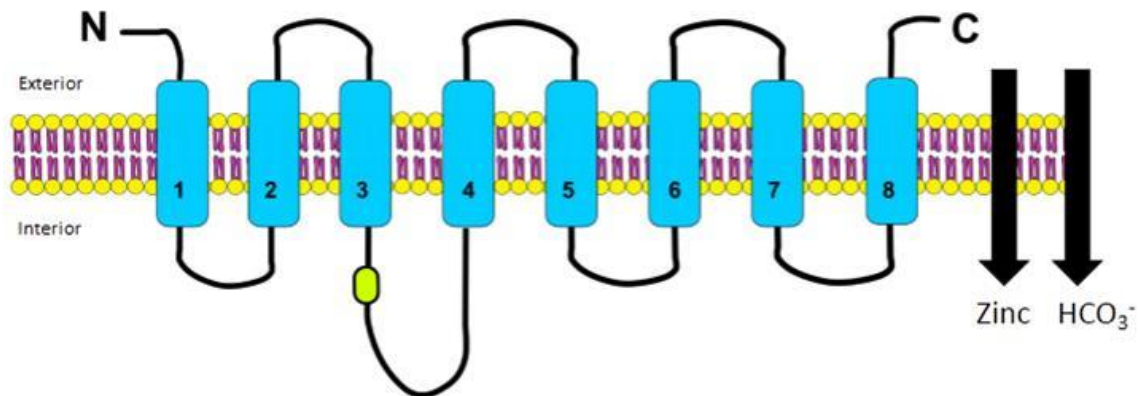


Figura 12. Topografía del transportador Zip.

Los transportadores Zip constan de ocho segmentos transmembranales. Los Zip actúan como simportadores, ya que meten zinc y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> al interior de la célula.

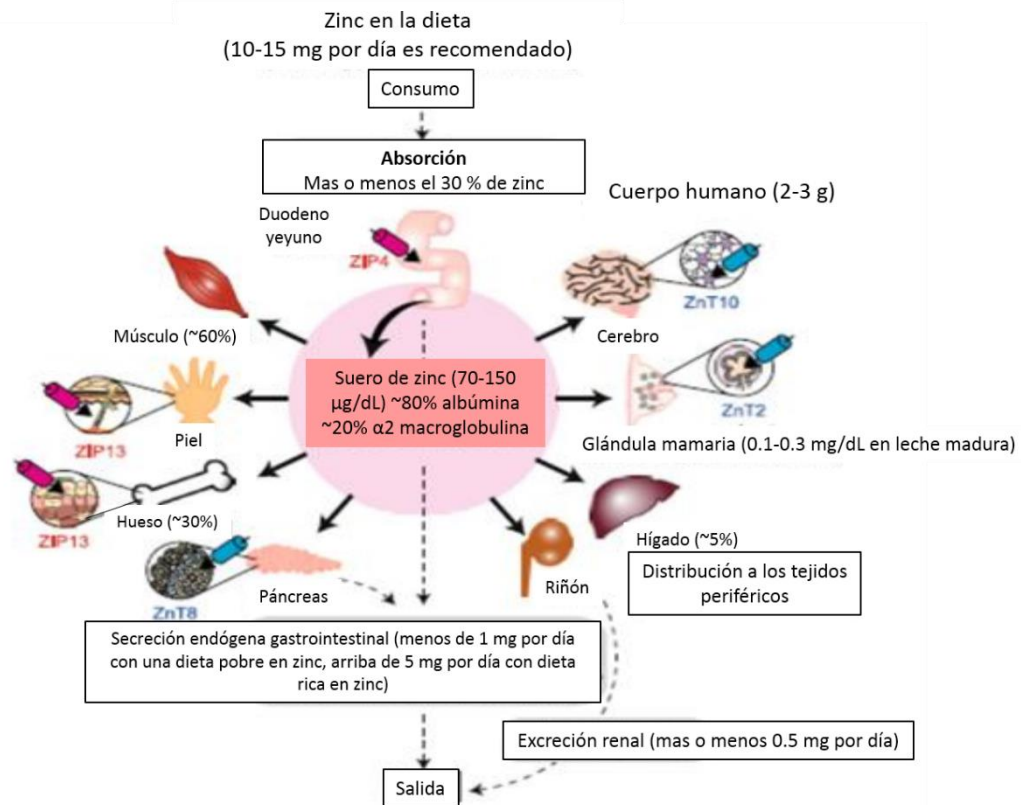
La dinámica del zinc durante la espermatogénesis se ha estudiado principalmente en humano. Mediante dichos estudios, se ha detectado la participación de varios miembros de los transportadores de zinc de las familias ZnT (*SLC30*) y Zip (*SLC39*) (22). Dichos transportadores se han detectado principalmente en el testículo y epidídimo de humano, pero su expresión en las células espermatogénicas y/o espermatozoides maduros no es concluyente.

Lo poco que se sabe del transporte de zinc es por estudios hechos en bacterias, plantas y levaduras (33). Estos estudios sugieren que los transportadores de zinc ZnT actúan como intercambiadores H<sup>+</sup>/Zn<sup>2+</sup> (29)(34). Estudios hechos en levadura y plantas, con homólogos de los transportadores ZnT demuestran que el transporte de zinc es dependiente del gradiente electroquímico generado por la V-ATPasa (33).

La oligomerización es necesaria en los transportadores, hasta el momento se sabe que en la línea celular DT40 los transportadores ZnT5 y ZnT6 se encuentran como heterodímeros (35). Como se mencionó anteriormente, los transportadores ZnT se encargan de disminuir la concentración de zinc citoplasmático. Sin embargo, en un estudio se detectó una variante del transportador ZnT5 en humano, llamada variante B, que mete y saca zinc del citoplasma (36), es decir tiene una función bidireccional.

En cuanto al área clínica, se sabe que la ingesta de zinc es muy importante y no debe excederse ya que se distribuye a diferentes órganos (Figura 13), por lo tanto el mal funcionamiento de estos transportadores puede generar enfermedades (28), como acrodermatitis enteropática, deficiencia de zinc neonatal, diabetes mellitus, etc., por ejemplo, defectos en Zip3 puede generar cáncer de próstata y páncreas, mientras que defectos en ZnT3 puede ocasionar cáncer de próstata (37).

En humanos, el transportador ZnT3 se encuentra principalmente en vesículas sinápticas, y se ha visto que mutaciones en este transportador genera Alzheimer (38).



Modificado de: T. Kambe *et al.*, 2014.

Figura 13. Distribución del zinc en los órganos.

Una vez ingerido, el zinc se distribuye a órganos como el músculo, piel, hueso, páncreas, hígado, riñón, glándulas mamarias, cerebro, etc.

## **Otras maneras de transportar zinc**

El transporte de zinc se da a través de los transportadores, aunque existen otras entidades moleculares que ayudan al transporte de zinc dentro y fuera de las células, como las metalotioneínas (MTs), la albúmina, es la proteína principal en el transporte de zinc en la sangre; canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como: Cav1.2, Cav1.3, canales Ca-A/K, TRPC6, TRPV6, TRPM3, TRPM6/7, TRPML1 y TRPA1; y sensores de zinc, como por ejemplo en eucariotas el sensor de zinc del factor de transcripción 1 (MTF-1) detecta la concentración de zinc y activa la expresión de proteínas con función de transportar el ion zinc (24).

## ANTECEDENTES

Se sabe que el ion zinc es crucial durante la espermatogénesis. Sin embargo, existe poca información acerca de la presencia de transportadores necesarios para mover al zinc dentro y fuera de las células espermatozógenas.

Existen estudios que muestran la expresión de los transportadores de la familia ZnT en diferentes tejidos (39)(40). Estudios *in silico* muestran la expresión de *Slc30a4* y *Slc30a6* en testículos de humano (41).

Anteriormente se ha demostrado mediante RT-PCR la expresión del ARN de todos los miembros de transportadores, tanto de la familia Zip y ZnT, en células espermatozógenas de rata, principalmente en células paquitenos y espermátidas redondas (Figura 14). Adicionalmente, observaron que las espermátidas redondas acumulan más zinc a lo largo del tiempo en comparación con las células paquitenos (Figura 15A), y su control usando el quelante de zinc TPEN (Figura 15B), para corroborar que es un incremento del ion zinc (42).

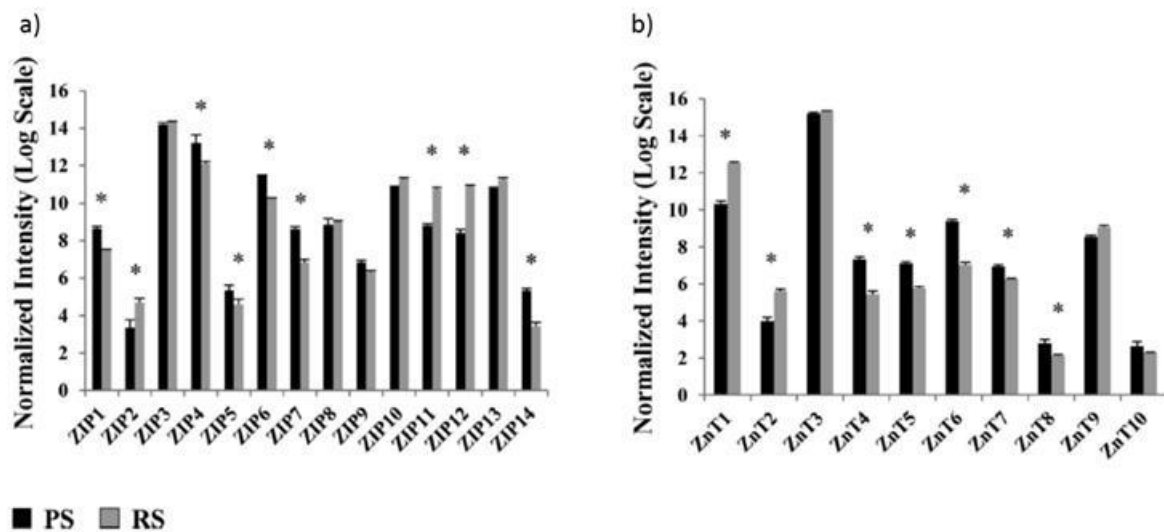


Figura 14. Expresión de los transportadores de zinc en células espermatozógenas de rata.

Intensidad normalizada a escala logarítmica de la expresión de cada miembro de los transportadores de la familia Zip (a) y ZnT (b), en células de paquitenos (color negro) y espermátidas redondas (color gris) (42).



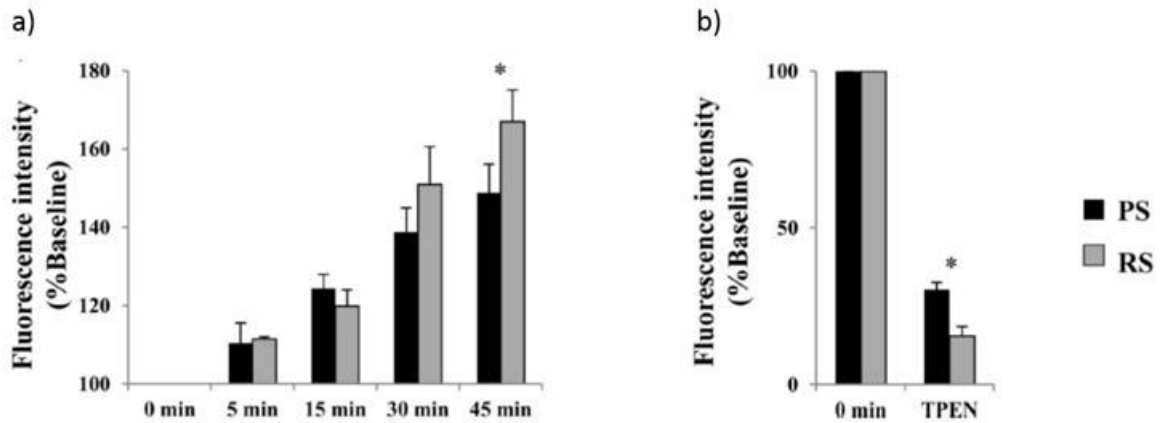


Figura 15. Transporte de zinc en células espermatogénicas de rata.

Panel a) Cuantificación de la fluorescencia a través del tiempo. En el panel b) se muestra que al añadir el quelante TPEN disminuye la fluorescencia. Color negro son células de paquiteno y color gris son espermátidas redondas (42).

También se han hecho estudios en humano, en donde se analizó la expresión de algunos transportadores de la familia ZnT y Zip, en muchas poblaciones celulares como: células de sertoli, espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides. En esos estudios observan que hay mayor expresión de los transportadores de la familia Zip en células espermatogénicas de humano (Tabla 3) (22).



## **Planteamiento del problema**

El conocimiento de la presencia de los transportadores de zinc en células espermatogénicas de ratón aún es limitado, y los reportes que existen se basan en células de humano y de rata. Sin embargo, dado que el zinc participa en diferentes etapas de la espermatogénesis, es importante profundizar en el conocimiento de la localización de algunos transportadores de zinc en las células espermatogénicas de ratón. Se propone usar como modelo el ratón, por la viabilidad de la obtención de las muestras y para aprovechar la experiencia del laboratorio. Nos enfocaremos a la búsqueda de los transportadores ZnT3 y Zip3, ya que existe un trabajo donde identificaron a estos transportadores con una mayor expresión a nivel de RNAm (42). Los hallazgos hasta el momento no han desarrollado aspectos relacionados con la expresión intracelular de los transportadores de zinc en nuestras células de estudio, por lo tanto, en este proyecto será de gran interés el hacer experimentos que nos permitan identificar la localización de los transportadores antes mencionados, en células espermatogénicas de ratón.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Identificar la localización de los transportadores de zinc Zip3 y ZnT3 en diferentes poblaciones de células espermatogénicas y espermatozoides de ratón.

### **Particulares**

1. Examinar la expresión y localización de los transportadores Zip3 y ZnT3 en células espermatogénicas de ratón y espermatozoides maduros, mediante anticuerpos específicos.
2. Analizar el flujo de zinc en células espermatogénicas de ratón, utilizando colorantes fluorescentes sensibles a zinc.

## **HIPÓTESIS**

Las células espermatogénicas y espermatozoides de ratón expresan los transportadores de zinc Zip3 y ZnT3, ya que la presencia de este metal es fundamental durante el desarrollo, maduración y función de los espermatozoides.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de aproximadamente 80 días, criados en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, y sacrificados bajo los estándares que establece el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **Obtención de células espermatogénicas y espermatozoides**

El ratón se sacrificó mediante dislocación cervical y se extrajeron los testículos y los epidídimos. Las células espermatogénicas se obtuvieron mediante digestión enzimática del testículo del ratón, siguiendo el protocolo de Bellvé y colaboradores (43). A los testículos se les retiró la túnica y se disgregaron enzimáticamente en un matraz de 125 ml a 33 °C, con la finalidad de obtener las células espermatogénicas. Posteriormente se le agregó 20 ml de medio Krebs 1X (en mM:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.97, NaCl 119,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.21, D-glucosa 11, KCl 4.82 y 0.01 g de colagenasa (para romper los enlaces peptídicos de los colágenos). Se dejó en agitación aproximadamente 10 minutos hasta que los túbulos se disociaron completamente. Los túbulos disociados se dejaron sedimentar en hielo y se lavaron tres veces con medio Krebs 1X. Enseguida se agregó 20 ml de tripsina (Tryple express 1X), el cual ayudó a romper las uniones entre las células. Se agregó 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNAsa y se agitó a 33 °C por 5 minutos o hasta que los túbulos se disgreguen. La muestra se pipetea con un bulbo de plástico para acelerar la ruptura de los túbulos. Se filtraron las células a través de una malla de Nitex de 80  $\mu\text{m}$  sobre un tubo que contenga 10 ml de medio Krebs 1X + 0.5 % BSA + 1.5 mg de inhibidor de tripsina. Posteriormente se realizó una centrifugación a 1,500 rpm por 10 minutos, se desechó sobrenadante y se transfirieron las células a un tubo nuevo. Una vez que se transfirieron las células, éstas se lavaron dos veces, la primera con medio Krebs 1X + 0.5% BSA y la segunda con medio PBS 1X. Se filtraron las células antes del último lavado. Finalmente, se resuspendieron las células en 2-3 ml de PBS 1X.

Por otro lado, los espermatozoides se obtuvieron siguiendo el protocolo de Alvau y colaboradores (44). Brevemente, a los epidídimos recién aislados se les realizaron cortes para permitir la salida de los espermatozoides. Los epidídimos cortados se depositaron en un tubo con medio TYH por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se recuperaron los espermatozoides viables y móviles contenidos en el medio TYH.

### **Medición de flujo de zinc**

Los experimentos de medición de flujo de zinc se realizaron de acuerdo a Garza-López y colaboradores, con algunas modificaciones (45). Brevemente se describen a continuación. Una vez obtenidas las células espermátogénicas de ratón mediante la disgregación enzimática, se incubaron con el colorante FluoZin™ -1 acetoximetil éster (AM, que es permeable a la célula; una vez dentro de la célula el grupo acetoximetil éster es hidrolizado y el colorante ya no puede salir). El FluoZin-1 se usó a una concentración de 5  $\mu$ M, incubándolo en presencia de las células por 1 hora en frío y protegidas de la luz. Posteriormente, las células se lavaron para retirar el colorante no incorporado. El lavado se realizó por centrifugación a 1,500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en medio TYH (en mM: NaCl 119.3, KCl 4.7, Piruvato de sodio 0.51, CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 1.71, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 1.2, Glucosa 5.56, HEPES 20. La longitud de excitación/ emisión de FluoZin™ -1 AM es: ~495/515 nm, respectivamente.

Las medidas de zinc se realizaron mediante dos técnicas: **1)** por microscopía de flujo, en donde se utilizó el Amnis® imaging flow cytometer, el cual cuenta con 12 canales, 5 láseres (405 nm, 488 nm, 561 nm, 592 nm y 658 nm), con objetivos de 60X, 40X y 20X, y los resultados se pueden analizar con el software IDEAS® y **2)** por mediciones de célula única, utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300), con un objetivo de 60X, empleando como fuente de iluminación un LED cyan, y un filtro de excitación de D485/25X, con un filtro de emisión HQ 510 LP y un espejo dicróico Q-505 LPXRU. Para la adquisición de las imágenes se empleó una cámara Charged Coupled Device (CCD) Andor Ixon Modelo DV887ECS-BV-500. Se tomaron 300 imágenes por segundo, con un tiempo de exposición

de 6 ms. Se hicieron registros a tiempo corto (~3 minutos) y largo (~50 minutos). Los resultados fueron analizados con el software ImageJ.

Para las mediciones de célula única, en un cubre objeto redondo se colocó 2  $\mu$ l de concanavalina a una concentración de 1 mg/ml, esto para que las células se peguen al cubre objeto y al agregar el medio en estudio no se muevan las células, esto nos permitió un mejor análisis, se dejó secar a temperatura ambiente.

### **Inmunocitoquímica en laminilla**

Las células espermatozógenas y espermatozoides previamente aislados, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Se depositaron 50  $\mu$ l de las células fijadas en las laminillas pre-tratadas. La muestra se incubó por 30 minutos en una cámara húmeda. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS 1X para retirar el paraformaldehído, incubando cada lavado por 5 minutos; enseguida las células se permeabilizaron con Tritón 0.1 % y se dejaron incubando por 10 minutos; al terminar la incubación se retiró el Tritón y se hicieron tres lavados con PBS. Al terminar el último lavado se hizo el bloqueo con BSA 5% durante 2 horas. Transcurrido el tiempo indicado, se retiró el BSA y se agregaron los anticuerpos primarios. En este caso, empleamos anticuerpos anti- ZnT3 y Zip3 (anticuerpos policlonales hecho en cabra que reconocen un dominio citoplasmático). Los anticuerpos se usaron a una dilución de 1:10 y se dejaron incubando con las células espermatozógenas a 4 °C protegidos de la luz durante toda la noche. Posteriormente se retiraron los anticuerpos y se hicieron tres lavados con PBS 1X. Se agregó el anticuerpo secundario (Alexa 647 conejo anti-cabra) disuelto en PBS (1:500) y se dejó incubando por 2 horas; se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron tres lavados con PBS 1X.

Las células espermatozógenas incubadas con los anticuerpos mencionados, adicionalmente se tiñeron con un colorante para núcleo (Hoechst 10  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS y se les agregó una gota de citifluor para preservar la fluorescencia. Finalmente se colocó un cubreobjetos y se selló con esmalte para evitar la evaporación.



## **Inmunocitoquímica por microscopía de flujo (AMNIS)**

Las células espermatogénicas y espermatozoides previamente aislados se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 minutos. La suspensión en PFA se centrifugó a 2,500 rpm por 6:30 minutos. Para obtener las células, se quitó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X. Las células fijadas se permeabilizaron por 15 minutos con 0.1% de Tritón en PBS, se centrifugaron y se lavaron con PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo con 5% BSA-PBS por 2 horas. Después del bloqueo se centrifugó la muestra, se quitó el sobrenadante y las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Zip3 y anti-ZnT3 (en 5% BSA-PBS-0.1% Tween) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifugó y se lavaron las células con PBS-T. Se incubó con el anticuerpo secundario Alexa 647 conejo anti-cabra, a una dilución 1:500 durante 1 hora (en PBS-T). Se incubó con el colorante Hoechst, 2 µg/ml para espermatozoides (a estas células se le agregó el colorante minutos antes de pasarlas por el AMNIS) y 10 µg/ml (durante 30 min., en frío y oscuro) para las células espermatogénicas. Las células espermatogénicas se centrifugaron a 2,500 rpm por 6:30 minutos y se lavaron con PBS 1X. Las células espermatogénicas y espermatozoides se incuban con 50 ng/ml de PNA-FITC durante 30 minutos a temperatura ambiente, el PNA-FITC (peanut agglutinin) es una lectina de cacahuete que se une a glucoproteínas, y se encuentra acoplado con una fluoresceína de sodio (FITC), que es un colorante con una longitud de excitación/ emisión de 460 nm/515 nm. Se centrifugó y se resuspendió en 25 µl de PBS 1X.

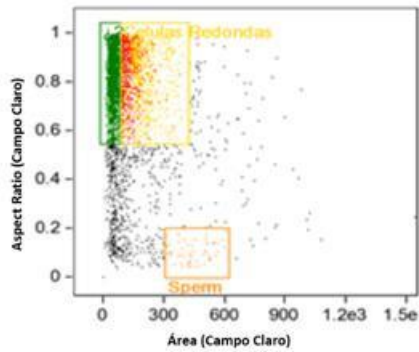
## RESULTADOS

### Identificación de diferentes poblaciones de células espermatoogénicas de ratón

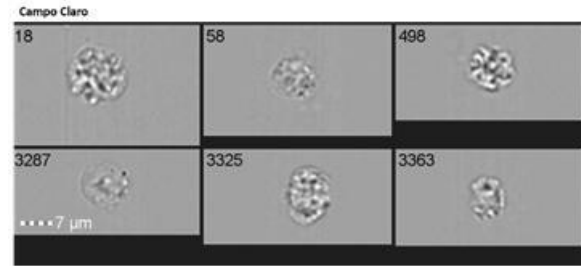
Para poder identificar diferentes poblaciones de células espermatoogénicas se propuso en un inicio hacer pruebas con un colorante que tiñe núcleo (Hoechst 33342), así se identificaron diferentes poblaciones celulares que representan los diferentes estadios de la espermatoogénesis, lo cual nos permitió mediante la incubación de las células con el anticuerpo primario de ZnT3 y Zip identificar en qué poblaciones se expresan los transportadores, los resultados de la identificación de los transportadores se muestran más adelante.

En la Figura 16A se puede observar el análisis por citometría de las poblaciones celulares. Mediante esta técnica se logró diferenciar tres poblaciones, representadas con tres colores distintos para facilitar la visualización. La población en verde corresponde a debris, por lo tanto, las descartamos de nuestro análisis. La población en color amarillo corresponde a lo que llamamos células redondas, que corresponde a las células espermatoogénicas de diferentes estadios. Finalmente, la población de color durazno corresponde a espermatozoides testiculares. Los puntos de color negro corresponden a células que se dejaron fuera del análisis, ya que corresponden a otros tipos celulares. Un ejemplo de las imágenes obtenidas de la población de células redondas se muestra en la Figura 16B. Mediante la tinción con Hoechst se observan tres poblaciones de células espermatoogénicas (Figura 16D), las del pico más alto corresponde a las células haploides ( $n$ ), seguido del pico de las diploides ( $2n$ ) y el pico más pequeño corresponde a las tetraploides ( $4n$ ). Para comparación, en la Figura 16C se muestra el histograma control, con células sin teñir. En las Figuras 16E y 16F se muestran dos imágenes representativas de células sin teñir y células teñidas, respectivamente. En las células teñidas se puede observar de manera clara el núcleo.

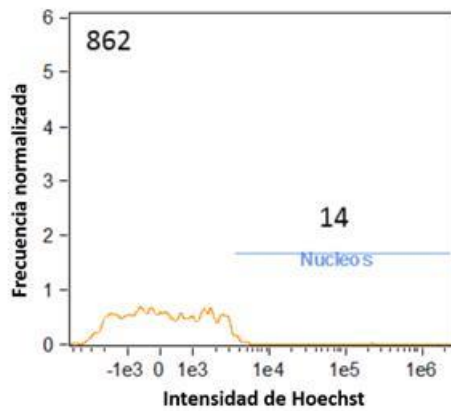
a)



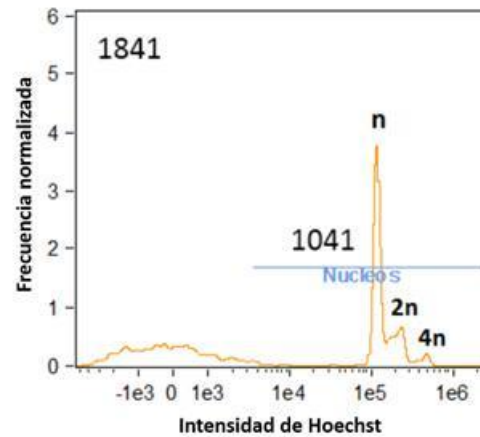
b)



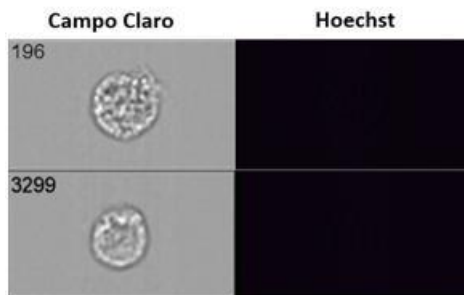
c)



d)



e)



f)

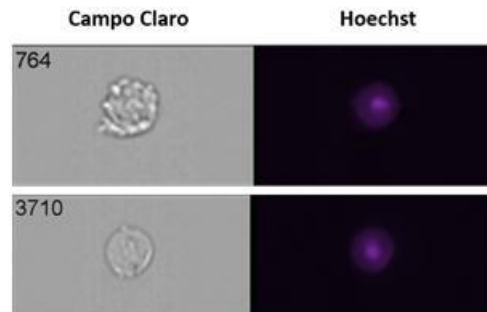


Figura 16. Obtención de poblaciones de células espermatozóicas de ratón.

Células espermatozóicas sin teñir y teñidas con Hoechst, **a)** gráfica de puntos donde se compara el área contra el radio de las células, en donde se puede observar tres diferentes poblaciones, éstas son: debris (verde), células redondas (amarillo) y espermatozóicos testiculares (naranja). **b)** Imágenes representativas de diferentes células redondas (color amarillo en panel a). **c)** Histograma de las células espermatozóicas sin teñir. **d)** Histograma de la fluorescencia de las células teñidas con Hoechst. **e)** Imágenes representativas de

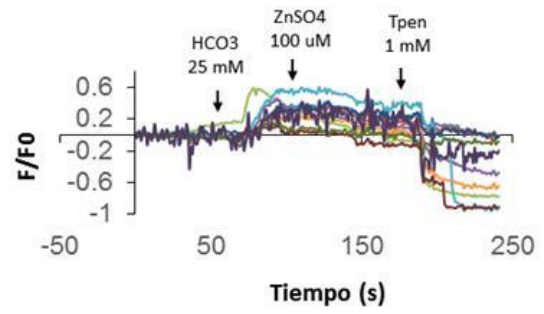
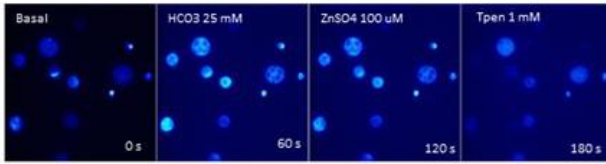
*células espermatogénicas sin teñir f) Imágenes representativas de células espermatogénicas teñidas con Hoechst, en donde se puede observar el núcleo de color morado. n=3*

## **Medición del flujo de zinc por célula única y microscopía de flujo**

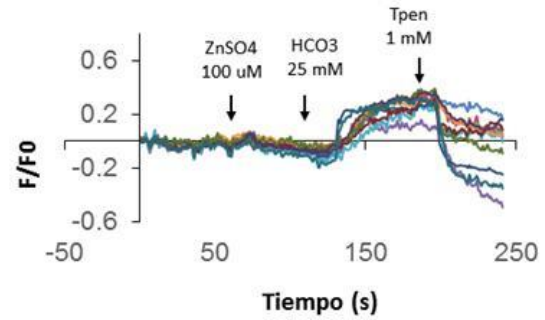
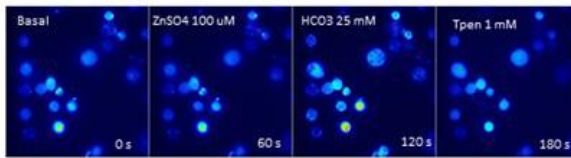
Para determinar el flujo de zinc se emplearon dos técnicas: **1)** registros mediante microscopía de epifluorescencia (Figuras 17 y 18) y **2)** microscopía de flujo (Figura 19). La estrategia de registro por microscopía de epifluorescencia consistió en realizar adiciones de zinc [100  $\mu\text{M}$ ] y posteriormente  $\text{NaHCO}_3^-$  [25 mM] o viceversa, con la finalidad de observar si existe un mecanismo de cotransporte entre ambos iones, lo cual podría asociarse a la activación de transportadores de la familia Zip.

En la Figura 17 se muestran imágenes representativas de células espermatogénicas cargadas con FluoZin-1. En el panel **a)** se muestra la adición de  $\text{HCO}_3^-$  [25 mM] a los 60 segundos. Posteriormente a los 120 segundos agregamos  $\text{ZnSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ , y finalmente Tpen (quelante de zinc) [1 mM] a los 180 segundos. En el panel **b)** primero se agregó 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ . Posteriormente a los 120 segundos se agregó  $\text{HCO}_3^-$  y finalmente a los 180 segundos se le agregó Tpen para quelar el zinc. En estas condiciones experimentales, sólo se observa un incremento de la fluorescencia al agregar  $\text{HCO}_3^-$  y no al agregar  $\text{ZnSO}_4$ , lo cual podría ser debido a un aumento del  $\text{pH}_i$ . Para descartar que dicho efecto sea por un cambio de  $\text{pH}_i$ , se midió el flujo de zinc mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [10 mM] como inductor de la alcalinización (Figura 17C). Sin embargo, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no indujo un incremento del zinc intracelular, lo que sugiere que el incremento de la fluorescencia no se debe a un incremento del  $\text{pH}_i$ . Por otro lado, decidimos investigar si la respuesta observada tras la adición de  $\text{HCO}_3^-$  pudiera deberse a que en el medio de registro haya trazas de zinc. Para demostrar lo anterior, los registros del flujo de zinc se llevaron a cabo adicionando inicialmente el quelante Tpen y posteriormente realizar una adición de  $\text{HCO}_3^-$  (Figura 17D). Sin embargo, incluso en presencia de Tpen, el  $\text{HCO}_3^-$  incrementó la concentración de zinc intracelular, por lo que podríamos pensar que el  $\text{HCO}_3^-$  es capaz de activar por sí sólo a los transportadores de zinc o que existe algún reservorio de zinc intracelular.

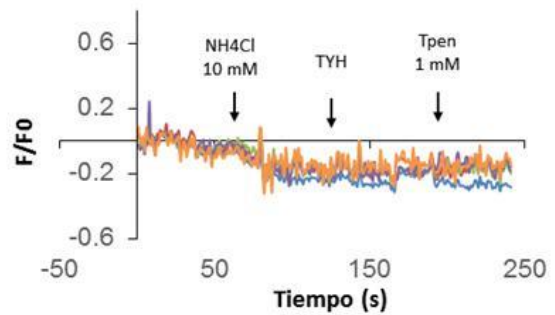
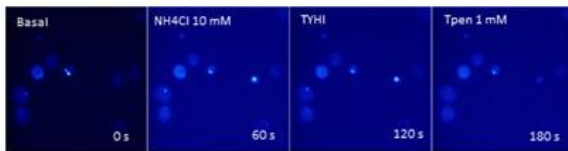
a)



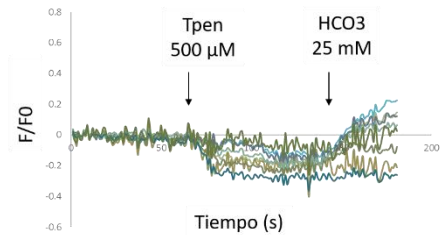
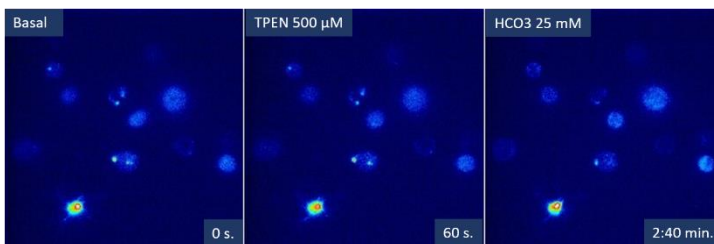
b)



c)



d)

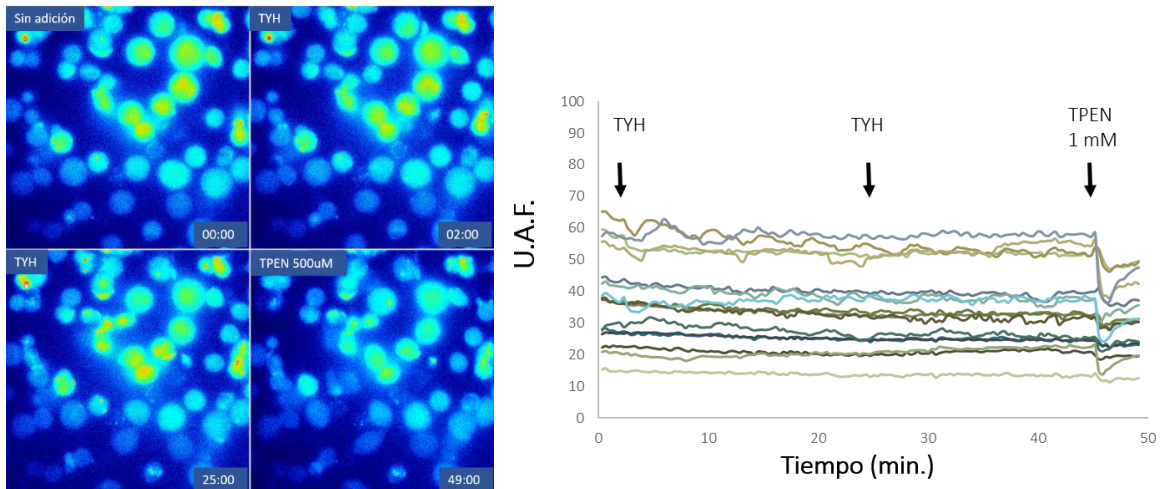


*Figura 17. El  $\text{NaHCO}_3$  incrementa la concentración de Zinc intracelular en células espermatoogénicas de ratón.*

A la izquierda de cada panel se muestran imágenes representativas de células espermatoogénicas cargadas con FluoZin-1. En la parte superior de cada recuadro se muestra la condición probada, y en la parte inferior el tiempo correspondiente. A la derecha de cada panel se muestran las cinéticas obtenidas de cada célula (1 línea = 1 célula), en donde se grafica la fluorescencia obtenida a lo largo del tiempo, con un tiempo máximo de registro de 250 segundos. Las flechas indican las adiciones de los compuestos señalados. **a)** Adición de  $\text{HCO}_3^-$ -  $\text{ZnSO}_4$ - Tpen. **b)** Adición de  $\text{ZnSO}_4$ -  $\text{NaHCO}_3$ -Tpen. **c)**  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -TYH-Tpen, y **d)** Tpen- $\text{HCO}_3^-$ . n=7

Debido a que la medición de los flujos de zinc se hicieron con una temporalidad corta y en los antecedentes se emplearon tiempos de hasta 50 minutos (46). Realizamos mediciones de zinc, a tiempos más largos. En la Figura 18A se muestra el flujo de zinc control, en donde a los 2 minutos se agregó medio de registro y a los 49 minutos se agregó el Tpen. Por su parte, en la Figura 17B se muestra el efecto de la adición de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , y la adición de  $1 \text{ mM}$  de Tpen a los 49 minutos. En este caso, se pudo observar un ligero incremento de zinc intracelular al agregar  $\text{ZnSO}_4$  en algunas células.

a)



b)

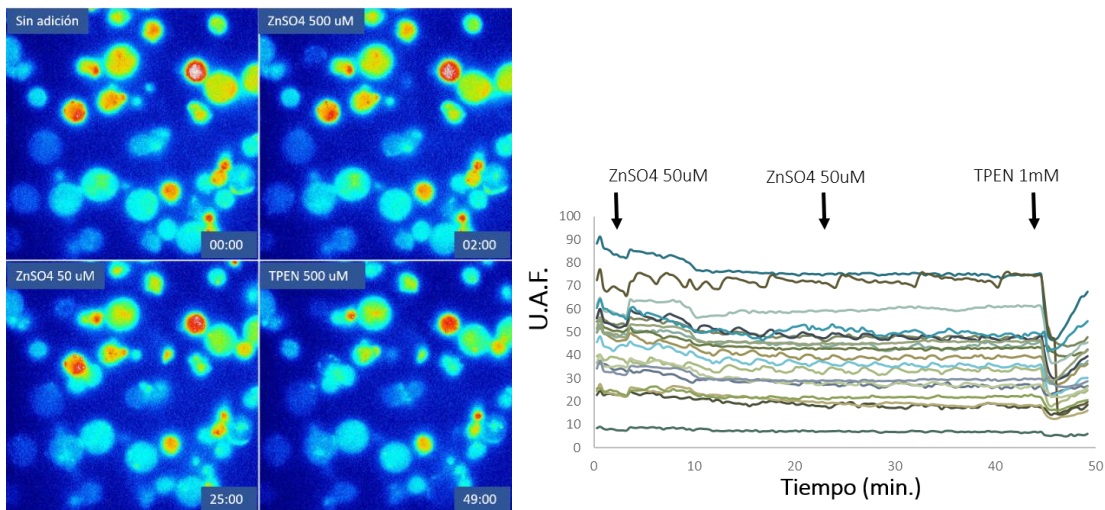


Figura 18. La adición de  $ZnSO_4$  no induce un incremento del zinc intracelular, incluso después de 45 minutos de incubación.

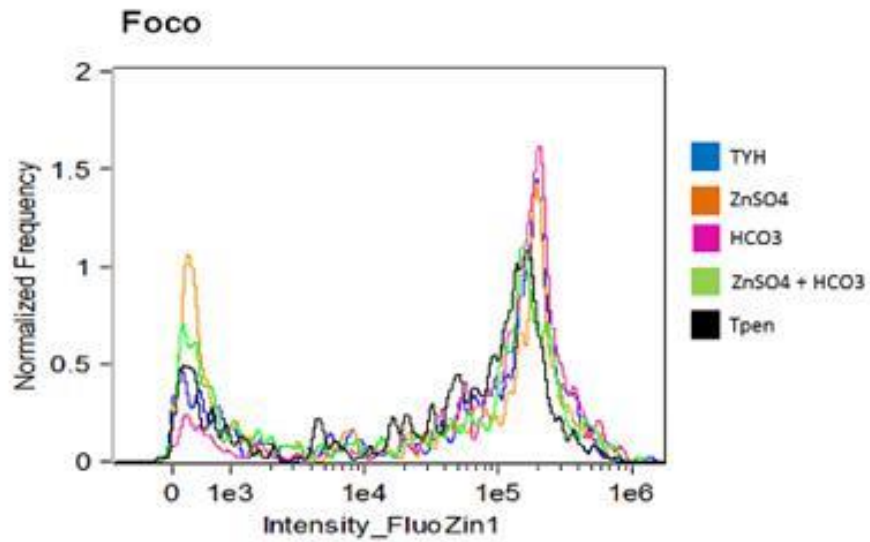
A la izquierda de cada panel se muestran imágenes representativas de células espermatogénicas cargadas con FluoZin-1, y a la derecha se muestran las cinéticas obtenidas de cada célula (1 línea = 1 célula), en donde se grafica la fluorescencia obtenida a lo largo del tiempo, con un tiempo máximo de registro de 50 minutos. En la parte superior de cada cinética se muestra la condición probada, y en la parte inferior el tiempo correspondiente. Las flechas indican las adiciones de los compuestos señalados. **a)** Adición de TYH-Tpen. **b)** Adición de  $ZnSO_4$ -Tpen.

Los datos obtenidos en célula única nos muestran resultados interesantes del incremento de fluorescencia con  $\text{NaHCO}_3$ , pero la población de células analizadas es pequeña, por lo que se llevaron a cabo experimentos con microscopía de flujo para incrementar el número de células analizadas.

En la Figura 19 se muestran las células espermatoogénicas cargadas con el colorante sensible a zinc FluoZin-1. Como control usamos medio TYH, y para observar si hay un incremento de la fluorescencia intracelular de zinc en nuestras células agregamos  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3 + \text{ZnSO}_4$  y finalmente Tpen. En la Figura 19A se muestra un histograma con la condición control (en azul), la adición de  $\text{ZnSO}_4$  (naranja),  $\text{HCO}_3$  (en rosa),  $\text{ZnSO}_4 + \text{NaHCO}_3$  (en verde) y Tpen (en negro). La fluorescencia se midió después de 40 minutos de haber agregado cada compuesto a las células espermatoogénicas. Se observa que no hay diferencia significativa en el desplazamiento de los trazos. En la Figura 19B se muestra una tabla con el promedio de fluorescencia, en donde se aprecia que cuantitativamente no hay un incremento significativo de la fluorescencia al agregar los medios anteriormente descritos, a diferencia del Tpen que sí genera una disminución de la fluorescencia.



a)



b)

Registry	Population	Count	%Gated	Mean
TYH	Foco & Round cells	244	100	215936.63
ZnSO4	Foco & Round cells	220	100	206627.3
HCO3	Foco & Round cells	220	100	218721.46
ZnSO4+HCO3	Foco & Round cells	253	100	202643.98
TPEN 45 min.	Foco & Round cells	199	100	166933.67

Figura 19. El zinc intracelular no incrementa en las células espermatoogénicas.

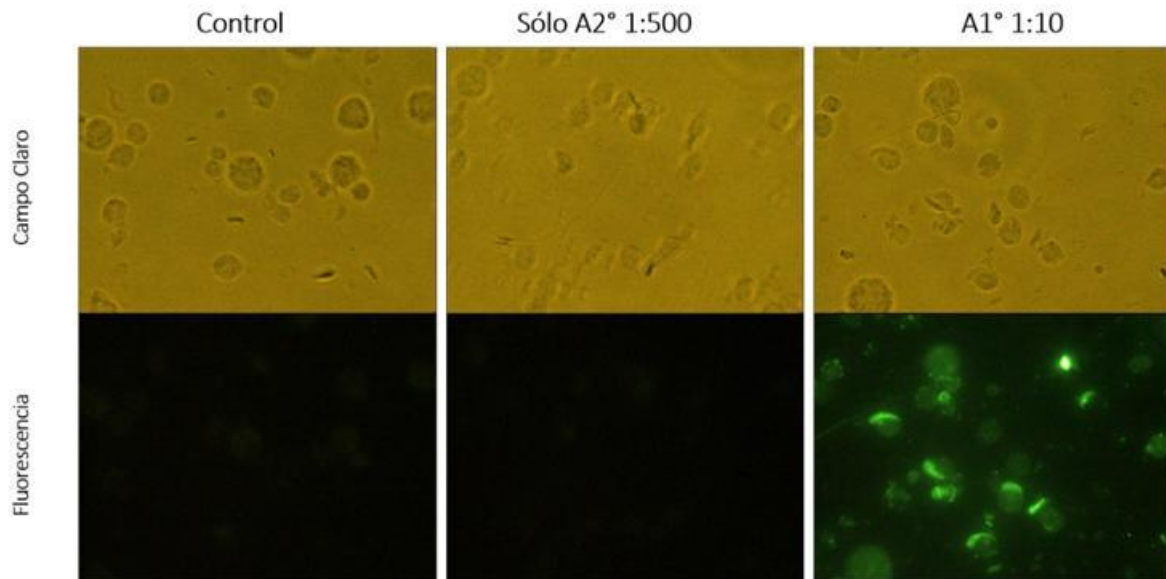
Panel a) Histograma de los datos obtenidos mediante microscopía de flujo, graficando la frecuencia de eventos respecto a la intensidad de fluorescencia (en este caso para FluoZin-1). Cada línea representa diferentes tratamientos durante un tiempo de incubación de 40 minutos. Los tratamientos mostrados corresponden a sólo medio (en azul), ZnSO<sub>4</sub> [100 μM] (naranja), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [25 mM] (rosa), coincubación ZnSO<sub>4</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (verde), y sólo Tpen (negro). En el panel b) se muestra una tabla con el promedio de fluorescencia de los diferentes tratamientos en a). n= 5

## **Identificación del transportador ZnT3 y Zip3 en células espermatogénicas y espermatozoides.**

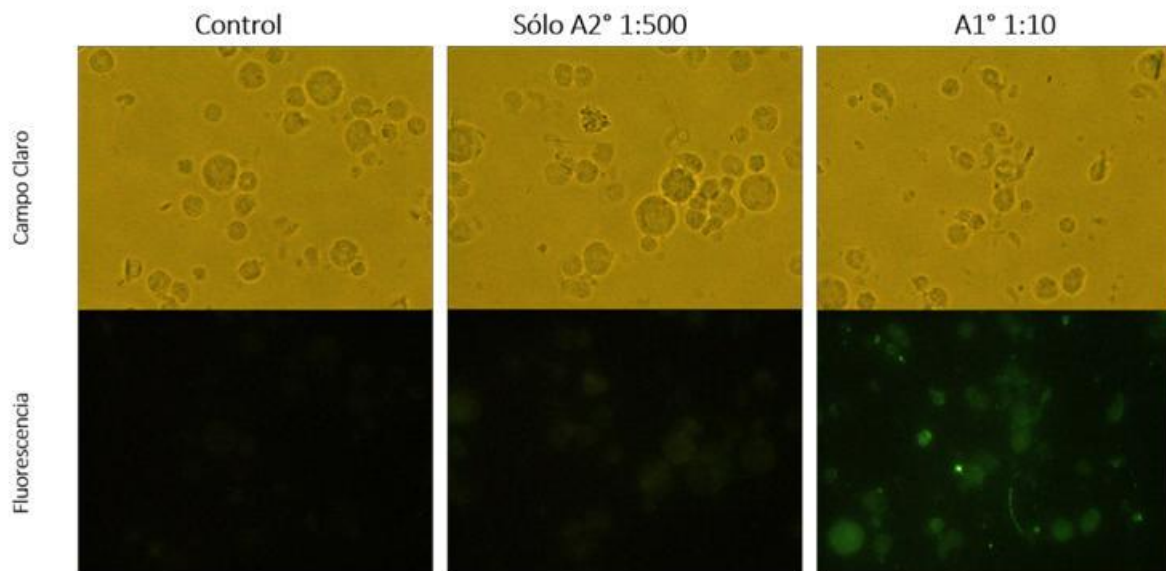
Para investigar la localización de los transportadores ZnT3 y Zip3, usamos anticuerpos específicos de cada transportador, los cuales detectan un epítipo de la proteína del lado citoplasmático. Realizamos ensayos de inmunocitoquímica para determinar la localización celular en los diferentes estadios de células.

Con el fin de evaluar los anticuerpos en sus condiciones óptimas, se hicieron curvas de concentración para decidir qué dilución de anticuerpo primario y secundario se usaría. Después de varias pruebas se decidió emplear una dilución de 1:10 del anticuerpo primario y 1:500 del anticuerpo secundario. En la Figura 20A se muestra la señal obtenida con el anticuerpo anti-ZnT3, en donde se puede observar una señal en las células espermatogénicas que suponemos es el acrosoma en formación. La Figura 20B muestra la señal obtenida empleando el anticuerpo anti-Zip3, la cual es homogénea en las células espermatogénicas.

a)



b)



*Figura 20. Localización de los transportadores ZnT3 y Zip3 analizados mediante inmunocitoquímica.* El transportador ZnT3 (a) se encuentra en la región del acrosoma en las células espermatogénicas de ratón, mientras que Zip3 (b) no muestra una localización clara. Las imágenes de la izquierda corresponden al control de autofluorescencia (en ausencia de anticuerpo primario -ZnT3 y -Zip3). Las imágenes del centro muestran el control sólo con el anticuerpo secundario (sin el primario). Las imágenes de la derecha corresponden a la condición de incubación con el anticuerpo primario (ZnT3 o Zip3) y en presencia del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. En la parte superior se muestran las imágenes de campo claro, y en la parte inferior la fluorescencia obtenida con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa-488. En la parte superior de cada imagen se muestra la dilución de anticuerpo empleada (1:10 de cada primario y 1:500 del secundario). n=3

Los datos obtenidos mediante la microscopía de flujo sugieren que la localización del transportador ZnT3 puede corresponder al patrón de tinción que se observa con marcadores de acrosoma en ratón (47), por lo que decidimos investigar si la localización del ZnT3 coincidía con el desarrollo del acrosoma. Por lo tanto, decidimos realizar experimentos de triple tinción, es decir, con el anticuerpo para ZnT3 (rojo), el marcador para acrosoma PNA [50 µg/ml] (verde) y el marcador para núcleo Hoechst (morado). En la Figura 21A se muestra una célula representativa del control sin tinción mientras que en la Figura 21B muestra las células con señal positiva para el transportador ZnT3, el cual se traslapa con el acrosoma. Adicionalmente, realizamos controles sin anticuerpo primario para darle confiabilidad a nuestros datos (Figura 21C). La competencia del anticuerpo primario con el péptido de competencia se muestra en la Figura 21D, en la cual se observa una reducción de la señal, aunque no desaparece por completo. Las células incubadas con el anticuerpo Zip3 se muestran en la Figura 21E, en donde no se observa señal de este transportador en la célula.

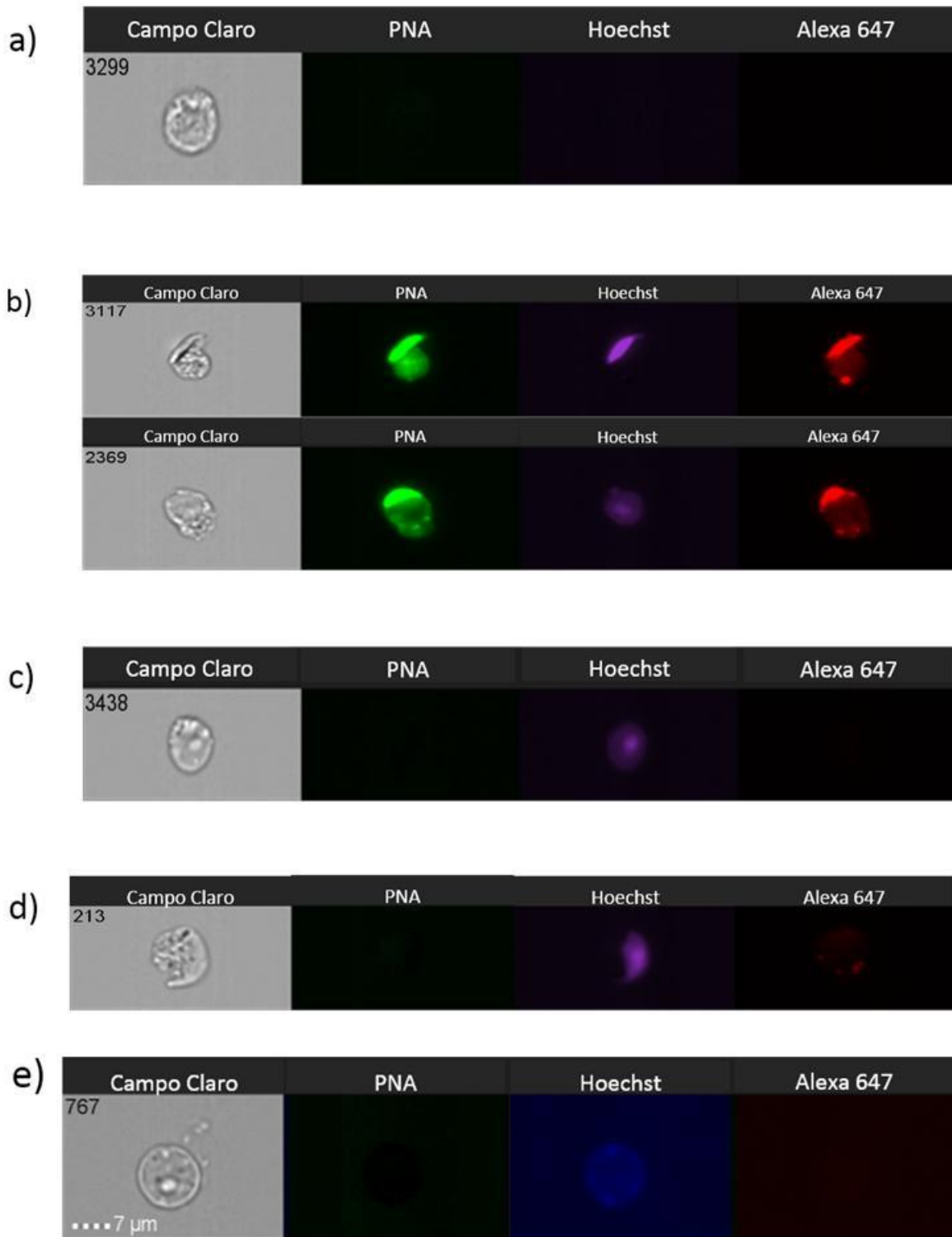


Figura 21. El transportador ZnT3 coincide con el desarrollo del acrosoma en células espermáticas de ratón.

Panel a) Control sin teñir, b) Células espermáticas incubadas con PNA (verde), Hoechst (azul) y ZnT3 (rojo), c) Control en ausencia de anticuerpo primario, d) Co-incubación del péptido + anticuerpo ZnT3, e) células incubadas con el anticuerpo Zip3. n=3

Una vez identificados los transportadores de zinc en las células espermatogénicas, se procedió a identificar mediante inmunocitoquímica los transportadores en el espermatozoide maduro. En la Figura 22 se muestran imágenes representativas de espermatozoides de ratón obtenidas del epidídimo. En la Figura 22A se muestra el control, sin anticuerpo primario ni secundario mientras que en la Figura 22B se muestra la triple tinción (con ZnT3, acrosoma y núcleo), indicando que ZnT3 se expresa exclusivamente en el acrosoma de los espermatozoides maduros. La Figura 22 C corresponde al control sin anticuerpo primario, pero en presencia de anticuerpo secundario y en la Figura 22D se muestra la competencia con el péptido correspondiente. Finalmente, en la Figura 22E se muestran los espermatozoides incubados con el anticuerpo Zip3, lo cual nos muestra que no hay señal de este transportador en el espermatozoide.

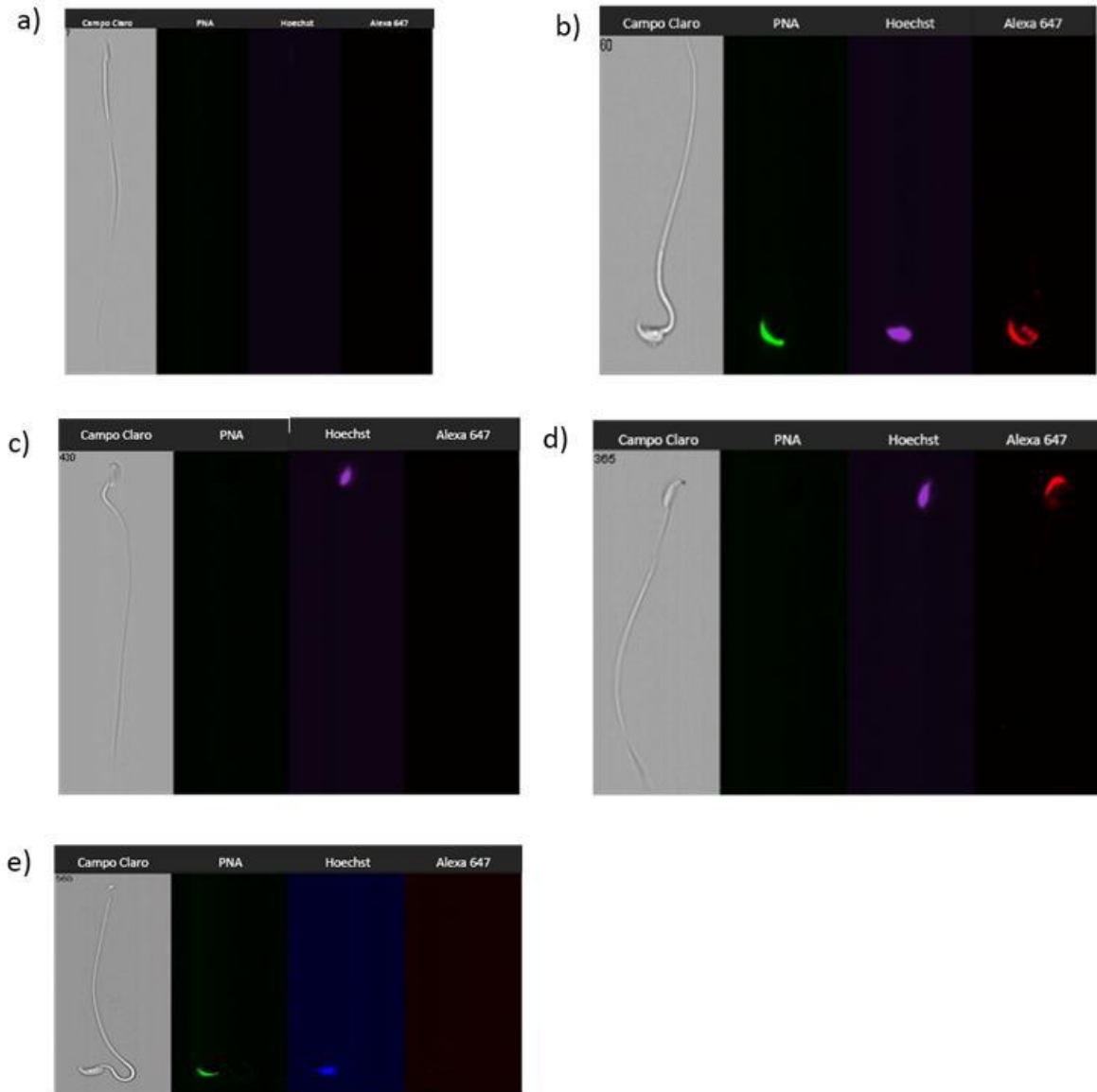


Figura 22. El transportador *ZnT3* se encuentra en la región del acrosoma de espermatozoides de ratón. Panel **a**) Control sin teñir, **b**) espermatozoides incubados con PNA (verde), Hoechst (azul) y *ZnT3* (rojo), **c**) Control en ausencia de anticuerpo primario, **d**) Co-incubación del péptido + anticuerpo *ZnT3*, **e**) incubación con el anticuerpo Zip3. n=3

De acuerdo a los resultados obtenidos y analizados se observa la expresión del transportador *ZnT3* coincide con la biogénesis del acrosoma, esto no se observó al analizar la expresión de los transportadores Zip3 (Figura 23). El histograma de células teñidas con Hoechst que identifica diferentes poblaciones de acuerdo a su contenido de ADN se muestra en la Figura 23A, donde se pueden observar tres poblaciones, la primera es las células haploides (n), la segunda son células diploides (2n) y la tercera con menor cantidad corresponde a células

tetraploides (4n). En la Figura 23B se muestran los controles, los cuales corresponden a células sin teñir (control) y células teñidas sólo con el anticuerpo secundario y Hoechst (Hoechst + 2nd Ab). En la Figura 23C se muestran tres poblaciones de células incubadas con el anticuerpo ZnT3, PNA y Hoechst, las cuales denominamos i, ii y iii, la i corresponden a una célula representativa de espermatozoides, la ii corresponde a una célula llamada espermátida redonda y iii corresponde a una célula condensante. Los mismos tipos de poblaciones celulares, pero de células incubadas con el anticuerpo Zip3 se muestran en la Figura 23D. Los resultados anteriores sugieren que el transportador ZnT3 aparece al mismo tiempo que se empieza a formar el acrosoma, mientras que no hay señal del transportador Zip3.

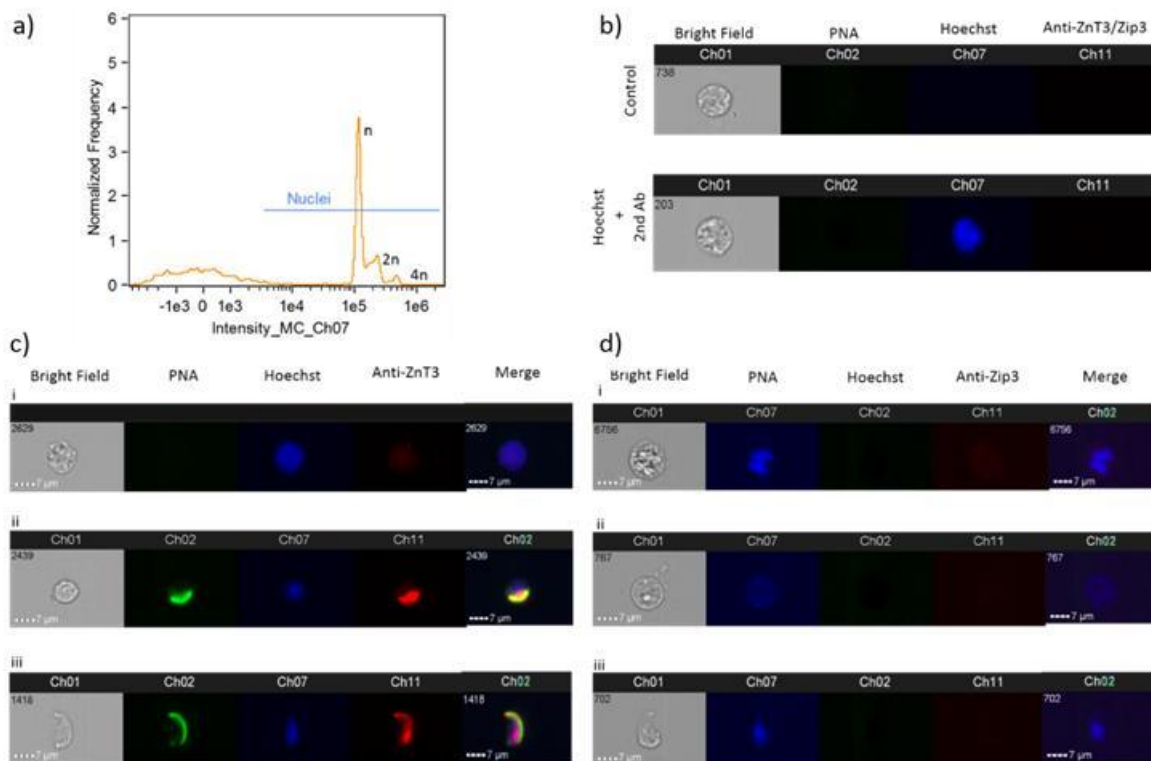


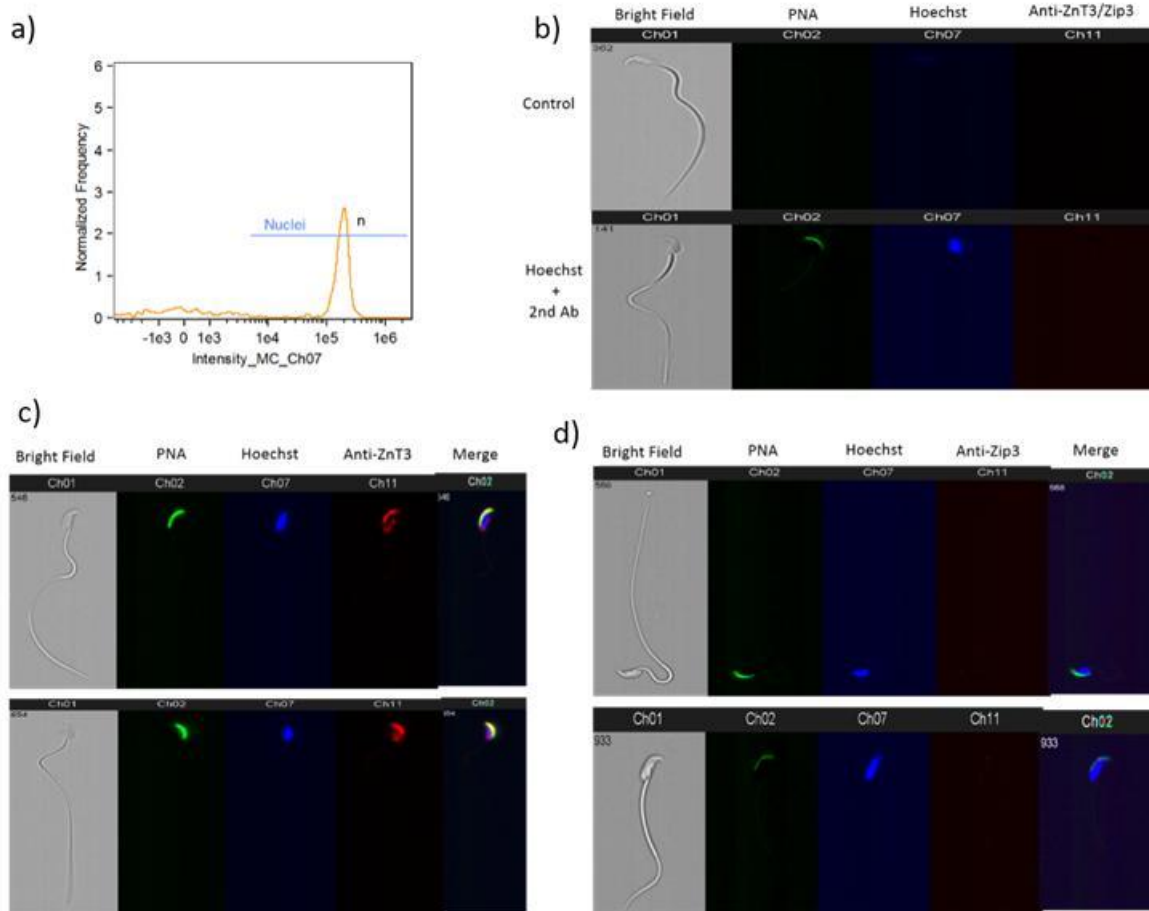
Figura 23. El transportador de zinc ZnT3 pero no Zip3 se expresa en diferentes poblaciones de células espermáticas de ratón.

Panel a) histograma de intensidad de fluorescencia de Hoechst, el cual tiñe al núcleo, mostrando diferentes poblaciones, las cuales corresponden a células haploides (n: espermátidas redondas y condensantes, y espermatozoides), diploides (2n: espermatozoides), y tetraploides (4n: espermatozoides). b) Imágenes representativas de nuestros controles, mostrando fluorescencia endógena (control, sin teñir), y la intensidad de fluorescencia en presencia de Hoechst más anticuerpo secundario (2<sup>nd</sup> Ab). c) imágenes representativas de (i) espermatozoides mostrando el núcleo (azul) y no hay señal de ZnT3 (columna Anti-ZnT3), (ii) imagen representativa de una espermátida redonda en donde se muestra el acrosoma (verde), núcleo (azul), expresión de ZnT3 (rojo) y la co-localización de ZnT3 con el acrosoma (merge, amarillo), (iii) imagen representativa de



una célula condensante, mostrando señal de ZnT3 (en rojo) en el acrosoma (verde y merge), **d**) imagen representativa de (i) espermatozoides, (ii) espermátida redonda, y (iii) célula condensante. En todos los paneles, la primera columna corresponde al campo claro (brightfield); la columna de PNA corresponde a la señal del acrosoma (verde). La columna de Hoechst corresponde al núcleo (azul). La columna de anti-ZnT3 o Zip3 corresponde a la señal de los transportadores ZnT3 o zip3 (rojo), y la co-localización (merge).

Adicionalmente, se realizó la comparación de ZnT3 y Zip3 en espermatozoides de ratón maduros (Figura 24). Los resultados obtenidos sugieren que ZnT3 se encuentra en el acrosoma, mientras que no se observó una señal para Zip3 ni en células espermatogénicas de ratón ni en espermatozoides maduros.



**Figura 24.** El transportador de zinc ZnT3 pero no Zip3 se expresa en espermatozoides maduros de ratón. Panel **a**) Histograma de intensidad de fluorescencia de Hoechst, que tiñe al núcleo, mostrando solo una población celular que corresponde a espermatozoides de epidídimo (n), **b**) imágenes representativas de los controles, mostrando fluorescencia endógena (control, sin teñir), y la intensidad de fluorescencia en presencia de Hoechst más anticuerpo secundario (2<sup>nd</sup> Ab). **c**) dos imágenes representativas de espermatozoides mostrando el acrosoma (verde), núcleo (azul) y la señal del transportador ZnT3 (rojo), así como la co-localización (merge), **d**) imágenes representativas de espermatozoides incubados con anti-Zip3, donde no se detectó expresión de Zip3. En todos los paneles, la primera columna corresponde al campo claro (brightfield); la columna de PNA

corresponde a la señal del acrosoma (verde); columna de Hoechst corresponde al núcleo (azul), la columna de anti-ZnT3 o Zip3 corresponde a la señal de los transportadores ZnT3 o zip3 (rojo), y la co-localización (merge).

## DISCUSIÓN

La presencia de transportadores de zinc en las células es de suma importancia, ya que debe estar controlada la concentración de zinc intracelular, porque si existiera una disminución o un exceso de zinc perjudicaría a las células, afectando la maduración de las células germinales, desestabilizaría a la membrana celular y ADN, así como afectaría a la movilidad del espermatozoide.

Es por eso que en este proyecto nos enfocamos a la identificación de los transportadores ZnT3 y Zip3 en células espermatozoides de ratón y espermatozoides. Para ello, las células espermatozoides se obtuvieron por un tratamiento enzimático, el cual nos permitió obtener mayor número de células espermatozoides. En ellas se utilizó la técnica de inmunocitoquímica, mediante la incubación con anticuerpos primarios (ZnT3 y Zip3), anticuerpos secundarios para detectar la localización de estos transportadores, y se incubaron con PNA (que marca el acrosoma) para poder corroborar que ZnT3 aparece en la biogénesis del acrosoma y en los espermatozoides maduros. Para poder analizar su localización, se utilizó microscopía de flujo, que a diferencia de otros estudios donde muestran la expresión de estos transportadores mediante microscopía de fluorescencia, nosotros pudimos observar hasta 5,000 células, lo cual nos da una gran ventaja por el número de células.

Desde trabajos anteriores (46), en donde analizan la expresión de transportadores de zinc en células espermatozoides, así como de los investigadores del área de la biología de la reproducción, se sabe muy poco de la localización intracelular de los transportadores de zinc en las células espermatozoides, los cuales se pueden encontrar en la membrana plasmática o en organelos. Identificar en dónde se encuentran estos transportadores es muy importante ya que podríamos sugerir su función. Estos transportadores son indispensables para una homeostasis adecuada de zinc y para que se lleven a cabo muchas funciones celulares de manera correcta, ya que tanto un exceso o disminución puede ser mortal para las células. Algunos estudios sugieren funciones específicas del zinc en las células espermatozoides, como crecimiento y desarrollo celular, condensación de la cromatina y modulación del estrés oxidativo.

Uno de los hallazgos más importantes del presente trabajo fue la identificación de una identidad molecular conocida como el transportador ZnT3, codificado por el gen *SLC30A3*, que se localiza en una vesícula muy particular de los espermatozoides llamado acrosoma. Este transportador aparece en la biogénesis del acrosoma, lo cual sugiere que esta proteína tiene un papel importante en la homeostasis de zinc durante el desarrollo del acrosoma, probablemente regulando las concentraciones de zinc, y no afectar su biogénesis, siendo ZnT3 el transportador encargado de meter zinc al interior del acrosoma. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Downey y colaboradores (46), donde observan una mayor expresión a nivel de RNA mensajero de los transportadores ZnT3 y Zip3 en células paquitenos y espermátidas redondas de rata, sin embargo nuestros resultados a nivel de localización celular solamente coinciden con la expresión de ZnT3, ya que los datos obtenidos para Zip3 no fueron concluyentes.

La relevancia de haber identificado al transportador ZnT3 en el acrosoma es que esto sugiere que se necesita la presencia de este transportador para sacar zinc del acrosoma, muy probablemente para ser utilizado ya sea de manera estructural o como cofactor de muchas proteínas que se encuentra en el acrosoma.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la identificación del transportador Zip3, codificado por el gen *SLC39A3*, sugieren que no es necesaria su participación en regular la salida de zinc del acrosoma, ya que no encontramos señal del transportador en esta vesícula. Este transportador podría regular la entrada de zinc al acrosoma actuando como simportador junto con bicarbonato, y generando una disminución de zinc en el acrosoma.

En cuanto a las medidas del flujo de zinc se utilizaron dos técnicas, 1) medición de zinc en célula única, 2) por microscopía de flujo. Para ambos casos, una vez obtenidas las células espermatozoides se incubaron con FluoZin-1 y se hicieron curvas de titulación para este colorante. Para la primera técnica se observaron por microscopia de epifluorescencia y se analizaron con un software llamado ImageJ. Mientras que en la segunda técnica se utilizó un citómetro de flujo acoplado a una cámara, la ventaja de esta técnica es que nos permitió analizar un mayor número de células. Sin embargo, en ambas técnicas no observamos cambios significativos del incremento de la fluorescencia de zinc al agregar  $ZnSO_4$ , ni a cortos ni largos tiempos. Pero sí se observó un incremento al agregar  $HCO_3^-$ , lo cual sugiere

que hay una participación de los transportadores Zip, que actúan como simportador  $Zn^{2+}/HCO_3^-$  y permitan la entrada de zinc extracelular o la salida de zinc de organelos, especialmente de los organelos ya que la incubación con el quelante TPEN no inhibe el incremento de Zn citosólico.

Son necesarios más trabajos experimentales para analizar la función de estos transportadores en la fisiología del espermatozoide. Esto se podría llevar a cabo mediante el uso de ratones nulos para ZnT3, y observar si hay alguna disrupción de la biogénesis del acrosoma, alteraciones de la movilidad, capacitación, RA que se manifieste con problemas de infertilidad. Así como hacer experimentos de flujo de zinc en célula única, utilizando menor concentración de zinc, ya que probablemente la concentración que se utilizó puede ser tóxico para la célula.

## CONCLUSIONES

Mediante la técnica de microscopía de flujo, identificamos tres poblaciones de células espermatogénicas, de las cuales al menos una corresponde a células haploides como los espermatozoides testiculares, una población correspondiente a células diploides, que pueden ser espermatogonias y espermátidas redondas; y la tercera población corresponde a células tetraploides.

Mediante mediciones de célula única utilizando el colorante sensible a zinc FluoZin-1, se logró observar cambios de fluorescencia al adicionar  $\text{NaHCO}_3$ , pero no a diferentes adiciones de zinc. Este incremento de la entrada de zinc no es debido a un incremento del pH intracelular, ya que la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no incrementó el zinc intracelular. Lo cual podría sugerir que el zinc se libera de pozas internas.

A pesar de que hay trabajos en donde sugieren que la entrada de zinc es de manera lenta, nosotros de acuerdo a las técnicas que usamos para medir el incremento de zinc intracelular a tiempos cortos y largos, no observamos un incremento significativo de la fluorescencia, pero sí al agregar  $\text{NaHCO}_3$ , probablemente porque nuestra concentración de zinc pudiera ser inhibitoria (20).

En cuanto a nuestros resultados de la localización de los transportadores, podemos observar que el transportador ZnT3 se expresa en el citoplasma, participa en la formación de la vesícula acrosomal de células espermatogénicas y permanece en el acrosoma de espermatozoides de epidídimo, mientras que el transportador Zip3 no muestra una señal clara en su localización celular, ni en células espermatogénicas de ratón ni en espermatozoides.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swanson WJ, Vacquier VD. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet.* 2002 Feb;3(2):137–44.
2. Qué es la reproducción y cuántos tipos hay [Internet]. 2016. Available from: <http://comofuncionaque.com/que-es-la-reproduccion/>
3. Reproducción asexual [Internet]. 2014. Available from: <http://biologia-test.blogspot.de/2014/10/reproduccion-asesual.html>
4. Lishko P V., Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu Rev Physiol.* 2012;74(1):453–75.
5. Suarez SS. Gamete Transport. In San Diego California: Academic Press; 2002. p. 3–22.
6. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *2006;12(1):23–37.*
7. Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis. *Spermatogenesis.* 2011;1(2):95–8.
8. Gervasi MG, Visconti PE. Chang ' s Meaning of Capacitation : A Molecular Perspective. 2016;874:860–74.
9. Chávez JC, Ferreira JJ, Butler A, De La Vega Beltrán JL, Treviño CL, Darszon A, et al. SLO3 K<sup>+</sup> channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem.* 2014;289(46):32266–75.
10. De La Vega-Beltran JL, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernandez-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, et al. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44384–93.
11. Zeng X-H, Navarro B, Xia X-M, Clapham DE, Lingle CJ. Simultaneous knockout of Slo3 and CatSper1 abolishes all alkalization- and voltage-activated current in mouse spermatozoa. *J Gen Physiol.* 2013 Sep;142(3):305–13.
12. Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* 2010;584(5):1041–6.
13. Ogura Y, Takagishi Y, Harayama H. Changes in the distribution and molecular mass of boar sperm acrosome-associated 1 proteins during the acrosome reaction; their validity as indicators for occurrence of the true acrosome reaction. *Anim Reprod Sci.* 2016;172:94–104.
14. Michailov Y, Ickowicz D, Breitbart H. Zn<sup>2+</sup>-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Dev Biol.* 2014;396(2):246–55.

15. Merrells KJ, Blewett H, Jamieson JA, Taylor CG, Suh M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. 2009;226–32.
16. Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt ROYH, Bavister BD. Role of Zinc during Hamster Sperm Capacitation '. 2018;1247(April):1238–47.
17. Oztürk A. Effects of Zinc and Melatonin Deficiency on Testicular Tissue of Rats. 2003;96:255–62.
18. Kumari D, Nair N, Bedwal RS. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology Effect of dietary zinc deficiency on testes of Wistar rats : Morphometric and cell quantification studies. J Trace Elem Med Biol. 2011;25(1):47–53.
19. Hosseinzadeh A. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutr Res. 2009;29(2):82–8.
20. López-González I, Treviño CL, Darszon A. Regulation of Spermatogenic Cell T-Type Ca<sup>2+</sup> Currents by Zn<sup>2+</sup> : Implications in Male Reproductive Physiology. J Cell Physiol. 2016;231(3):659–67.
21. Zhao J, Dong X, Hu X, Long Z, Wang L, Liu Q, et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2016;6(October 2015):22386.
22. Foresta C, Garolla A, Cosci I, Menegazzo M, Ferigo M, Gandin V, et al. Role of zinc trafficking in male fertility: From germ to sperm. Hum Reprod. 2014;29(6):1134–45.
23. Lishko P V, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. J Physiol. 2010;588(Pt 23):4667–72.
24. Maret W, Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. Chem Rev. 2009;109(10):4682–707.
25. Gazaryan IG, Krasinskaya IP, Kristal BS, Brown AM. Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition. J Biol Chem. 2007;282(33):24373–80.
26. Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. Neuroscience. 2009;158(1):126–36.
27. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. Cell Mol Life Sci. 2004;61(1):49–68.
28. Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. 2014;3281–95.
29. Chao Y. Kinetic Study of the Antiport Mechanism of an Escherichia coli Zinc Transporter , ZitB. 2004;279(13):12043–50.
30. Schweigel-Röntgen M. The Families of Zinc (SLC30 and SLC39) and Copper (SLC31) Transporters. Vol. 73, Current Topics in Membranes. 2014. 321-355 p.



31. Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian Zinc Transporters. *Annu Rev Nutr.* 2004;24(1):151–72.
32. Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. 2006;1763:711–22.
33. Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershinkel M, et al. Identification of the Zn<sup>2+</sup> Binding Site and Mode of Operation of a Mammalian Zn<sup>2+</sup> Transporter. 2009;284(26):17677–86.
34. Lu M, Fu D. Structure of the Zinc Transporter YiiP. 2007;317(September):1746–9.
35. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Ishihara K, Nagao M, Yamaguchi-iwai Y, et al. Two Different Zinc Transport Complexes of Cation Diffusion Facilitator Proteins Localized in the Secretory Pathway Operate to Activate Alkaline Phosphatases in Vertebrate Cells. 2005;280(35):30956–62.
36. Valentine RA, Jackson KA, Christie GR, Mathers JC, Taylor PM, Ford D. ZnT5 Variant B Is a Bidirectional Zinc Transporter and Mediates Zinc Uptake in Human Intestinal Caco-2 Cells \*. 2007;282(19):14389–93.
37. Pan Z, Choi S, Ouadid-ahidouch H, Yang J, Beattie JH, Korichneva I. Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. 2017;623–43.
38. Lee J, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh J. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. 2002;99(11):7705–10.
39. Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet.* 1997;17(3):292–7.
40. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26389–95.
41. Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A. In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics.* 2004;5(1):32.
42. Downey AM, Hales BF, Robaire B. Zinc Transport Differs in Rat Spermatogenic Cell Types and Is Affected by Treatment with Cyclophosphamide. *Biol Reprod.* 2016;95 (1)(22):1–12.
43. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1977;74(1):68–85.
44. Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development.* 2016;143(13):2325–33.
45. Garza-López E, Chávez JC, Santana-Calvo C, López-González I, Nishigaki T. Cd<sup>2+</sup>sensitivity and permeability of a low voltage-activated Ca<sup>2+</sup>channel with CatSper-like selectivity filter. *Cell Calcium [Internet].* 2016;60(1):41–50. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2016.03.011>

46. Downey AM, Hales BF, Robaire B. Zinc Transport Differs in Rat Spermatogenic Cell Types and Is Affected by Treatment with Cyclophosphamide. *Biol Reprod.* 2016;95(1):22–22.
47. Nakata H, Wakayama T, Takai Y, Iseki S. Quantitative Analysis of the Cellular Composition in Seminiferous Tubules in Normal and Genetically Modified Infertile Mice. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(2):99–113.

## ABREVIATURAS

**Acrosoma:** Organelo que contiene enzimas hidrolíticas y se encuentra en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide.

**Anticuerpo:** Son glicoproteínas del tipo gammaglobulina, y son empelados para identificar y neutralizar moléculas extrañas.

**Axonema:** estructura interna de los flagelos, que se conforma por microtúbulos.

**Capacitación:** Evento de maduración del espermatozoide a través del tracto reproductor femenino necesaria para una fecundación exitosa.

**CDF:** familia de facilitadores de difusión de cationes.

**Células del *cumulus oophorus*:** células que rodean al ovocito.

**Citometría de flujo:** técnica de análisis de miles de células que se caracteriza por la medición de la dispersión de la luz y fluorescencia que poseen las células.

**DEDTC:** Ácido dietildihioicarbámico. Es un quelante de zinc permeable.

**DTPA:** Ácido pentético, es un quelante de zinc, en donde su base conjugada tiene una alta afinidad por metales catiónicos.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético, es una sustancia que se usa como quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica.

**EGTA:** Tetra (acetoxymethyl Ester). Es una sustancia que se utiliza como quelante de metales, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Enzima hidrolítica:** Enzimas que aceleran las reacciones en las que una sustancia se rompe en componentes más simples con moléculas de agua.

**Epidídimo:** órgano situado en el borde posterior del testículo.

**Espermatogénesis:** proceso de formación de las células sexuales masculinas.

**Espermatozoide:** Gameto masculino haploide que se fusiona con el óvulo para formar un nuevo organismo.

**Espermiogénesis:** proceso en el cual a partir de las células espermáticas se convierten en espermatozoides.

**Fecundación:** proceso en el cual se fusionan el gameto masculino con el gameto femenino.

**Flagelo:** segmento del espermatozoide más largo que ayuda al movimiento del espermatozoide.

**FluoZin™-1 AM:** Es un colorante fluorescente que permite observar la presencia de zinc dentro de las células, ya que éste es permeable. Tiene una longitud de onda de excitación de ~495 nm y de emisión de ~515 nm.

**Gen:** Segmento de DNA que codifica para alguna proteína.

**Hiperactivación:** Incremento de la velocidad, incremento de la amplitud del batido flagelar y movimiento más vigoroso.

**Hiperpolarización:** cambio del potencial de reposo de la membrana, haciéndose más negativa.

**Hoechst 33342:** (2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato). Es un colorante fluorescente de ADN, que se utiliza para observar el núcleo de las células. Su longitud de onda de excitación es ~361 nm y de emisión ~497 nm.

**Ki:** Constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.

**Ovocito:** También llamado óvulo, es el gameto femenino haploide que se va a fusionar con el espermatozoide.

**PNA (Peanut agglutinin):** es una lectina de la planta de cacahuate, que se une a glicoproteínas que se encuentran en el acrosoma.

**Reacción acrosomal (RA):** Proceso exocitótico que experimenta el espermatozoide y que se caracteriza por la liberación de enzimas hidrolíticas.

**Testículo:** glándula sexual masculina que produce los espermatozoides.

**TPEN:** N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridinylmethyl)-1, 2-ethanediamine. Se utiliza como quelante de zinc.

**Tracto reproductor femenino:** Es el sistema sexual femenino que se conforma de vagina, útero, oviducto y ovarios.

**Tricina (N-(Tris(hidroximetil)metil)glicina):** componente orgánico que se usa como solución buffer.

**Zinc:** Metal de transición divalente, su símbolo es  $Zn^{2+}$ .

**Zip:** Transportador que permite la entrada de zinc hacia el citosol, se puede encontrar en la membrana plasmática o en organelos, y es codificado por el gen *Slc39*.

**ZnT:** Transportador que permite la salida de iones zinc, se puede encontrar en la membrana celular o en organelos, y es codificado por el gen *Slc30*.

**ZP:** Zona pelúcida, es la capa externa que rodea al ovocito de los mamíferos.