



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **BELTRAN RODRÍGUEZ ANGELICA ESPERANZA** con número de matrícula **20134000814** cuyo título es:

"Mapeo de distribución de receptores de speract en espermatozoides de erizo de mar con péptidos marcados."

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)**

Cuernavaca, Mor a 02 de diciembre del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD
DR. ADAN OSWALDO GUERRERO CARDENAS
DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

TAKUYA NISHIGAKI . | Fecha:2021-12-02 13:18:48 | Firmante

ICbz5awsA3sZfaK2J1a3pfqmA9rffWnK8mRTxXdmCS+Rf5B68XUqbYV8JKMSEbLuWsrWw1NkaVxfAtzPpfJjZwdfmMWS0JfyugTyC9r7UF023yBLtzqsi/PyKAKe3Oq+AuZe+RZnqSHNBwzccmBtLboxry5RQ/a6Z/Zvgb+SYWUub6J2WwuR2yXKpr/KQpIWFwGJAVM724Gu7m451d6DzfhLLZ+v5Suo6QePjYcEqknI6jKdnx9a8mrlj8o6Y4u+2o+7KSOUYluTsfkv/iH3yQvtv7ZoUoxDm13QO1eWVG8bpfRK26CmmiE6EJz+THmhjUADHWwWW5FSPSjBQqyYj06SQ==

CHRISTOPHER DAVID WOOD . | Fecha:2021-12-02 13:29:08 | Firmante

Fo2kNiRyW3zFcn3Ci3bUf2ASahNRJjexSNzWK6YO5CGPgMjQ9lkMnWcWbx4uFpNDofK4CBS22NmK1azHF50B9ySIFS5YUf+oNPtbkFBIAK/oEQoSXq4kO6Wta6U2+z9Ha82FLHD38506/xsa1vjcmZsoGqhMzBTBzFbp9PadoCprVP/msHCJ1bSFFmlta2ZLnC4960RtITAEpGm2fPzgabCnkSyvVhRcCextDPDDzlbz7WRp8QKMjNu7XONlb/pxKWEhErly++IE9iDwWdUkGPW5u3X7QZjVoB5ot2+ZOHKwNuKXdTS+Pg7bZ3tDjVAGQJDoHIDlwbrls7pBP8Ofa==

CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA | Fecha:2021-12-02 13:29:44 | Firmante

ntL1F8ia3rkOVcWeitE9pmH7DtRoxlZZQlvjHHHwFgZqaTATL8qUDS2r1np9naz/VhvQuokVOaoyASe2VUzWBPJ2L6hd1fzfl9hz2HjZacaRKBpPxWqBimIaXZd9J3fH2sWc1HVwNi1M+xEi7izt/ETGGgewRRc7cl6mnXcjeDh1iDIm+n5z/1MeEVu8rolbdwRMAYnuUsnqWGrK10zLzQ/rIAYPjqdbfVHC+6gWQX8CVJrNLitypGFx5GREzgeWdOUyMKrOc8g42NG3tClnkxjF5ZJEZ7Ffs1TuNcvtz6NokHku0UaDB6ZEh7oSzwJkV/2X27ddsLQWWE8rE/5Q==

ADÁN OSWALDO GUERRERO CÁRDENAS | Fecha:2021-12-02 17:38:39 | Firmante

o55ihkyyFihLK+sS9pEHJrxKGBBLhQJsq8t8XhwsUapGhkqcbDx+tLYtQM122crcSuZMpjOwj1N2c6Bo3wi5uWpoQXEKXIX15NsVTiKxeKBG5jEsWK6gS1apBrbAWsQ5bQTZCk5u+8mYcMSOWlpXiVj0YHgs6r3vxcJMkmP2pksqjrbB9o/LdQTxE1xrm6G2GOW0+rEBrOUqF2+3xrTFjABsufi6n+c1BMJvozuhtlNCeQkW65D/Fkz/aZ/9YXGKWUnN3Bu6slxblglwlyXG2qxvqN80o0EybdzNwf+Hz/kgJUKeQ/W/XxU6THtrIH7zLSMKLLabHY1SPWe4g==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2021-12-03 07:54:27 | Firmante

caa4/h/Evix7o6RmqihFRWf8rn27SykJ+a22j0NNWaChHBpgzVXiW4TtXtYyruaiqdDdcsMsskkZn+xl3m0RnTww7jET9JKGJtT7wnE1rcArpa67QrpKVI/ij7eHYIrJ65/zU9KYFH4m3abRxxHB+t+yz0Jx5QMui/1UW2/tZmlppQHb5svwDX2h+CpM7WygqKwmltBTv2ktGL8/MLb0eunK5WIHu+upc1ZN2Cjr5OKhJff6v1X8s461RNh1z6GIEhqKY6wqyeOlf8cwrwwVafSSih01EyENfH0CpeuePWKP3sjBsquO4ylbq5gR0mMs1NkFaN36Qz8/myMww==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



AYKa7Q9d3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZymErgViK5PWf0v6UxSy9neqX4HVhCLt>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINAMICA CELULAR

**Licenciatura en Ciencias Área terminal en bioquímica y
biología molecular**

**“Mapeo de distribución de receptores de speract en
espermatozoides de erizo de mar con péptidos marcados.”**

T E S I S

**PRESENTADA POR:
ANGÉLICA ESPERANZA BELTRÁN RODRÍGUEZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS**

**DIRECTOR DE LA TESIS:
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD**

**SINODALES:
DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2021

PROYECTO REALIZADO EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y EL LABORATORIO NACIONAL DE
MICROSCOPIA AVANZADA



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

LNMA

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE
INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA UNAM IN211216
“DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE COMPONENTES DE SEÑALIZACIÓN EN LOS FLAGELOS
DE ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR QUE REGULAN SU RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA”

EL EQUIPO DE MICROSCOPIA SE PROPORCIONÓ Y SE MANTUVO A TRAVÉS DE CONACYT GRANTS
123007, 232708, 260541, 280487, 293624.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Claudia Martínez Anaya por donarnos el kit de marcaje de Cy5- NHS, a Timoneo Olamendi y Paul Gaytan por su ayuda técnica con el HPLC, a Fernando Zamudio por ayudarnos en la espectrometría de masa, a Ernesto Ortiz por las consultas técnicas, a César Arcos Hernández por donarnos las proteínas de fusión y su ayuda en el espectrofluorímetro , a Gastón Contreras por su apoyo en el microscopio, así como al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, y a los patrocinadores PAPIIT: IN-211216 y CONACYT: 123007, 232708, 260541,280487, 293624, 225179.

RESUMEN

Speract es un decapeptido de secuencia consenso GFDLNGGGVG liberado por la capa de gelatina de los huevos de erizos de mar, que funciona como quimioatrayente del espermatozoide e inicia una cascada de señalización que genera cambios en el espermatozoide como aumentos en $[Ca]_i$, pH_i y cGMP, que conllevan a la reorientación del nado del espermatozoide.

Para realizar todas estas alteraciones en la fisiología del espermatozoide, speract debe unirse a su receptor, una glicoproteína membranal de 77kD ubicada en el flagelo.

Hasta la fecha sabemos que este receptor contiene dominios extracelulares con presencia abundante de cisteínas, y que su localización se confina a micro dominios lipídicos formando agrupaciones, sin embargo, no existen imágenes de microscopía que corroboren la formación de estas agrupaciones, debido a que el tamaño de los receptores se encuentra por debajo del límite de difracción de la luz. En esta investigación buscamos la generación de imágenes de súper resolución que confirmen la formación de estas agrupaciones en la membrana del espermatozoide de erizo de mar utilizando un speract sintético que denominamos G-speract (GGSGGGFDLNGGGVG) unido a colorantes fluorescentes.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras.....	iii
Lista de graficas.....	iv
Lista de tablas.....	v
Abreviaturas	v
Dedicatorias	vi
Capítulo I: introducción	1
El erizo de mar como modelo de estudio.....	2
Morfología del espermatozoide de erizo de mar.....	3
Capítulo II: Antecedentes y marco teórico.....	4
Speract y su receptor.....	4
Sobre fluoróforos y fluorescencia.....	7
Microscopia de super resolución para resolver estructuras celulares.....	10
Capítulo III: hipótesis, objetivos, justificación.....	17
Capítulo IV: Metodología	19
Etiquetado, purificación y caracterización de cy5-gsperact.....	20
Experimentos de súper resolución.....	20
Optimización de las condiciones experimentales utilizando distintos sistemas reductores de oxígeno.....	21
Capítulo V: Resultados.....	23
Respuesta del espermatozoide a G-speract.....	23
Separación y aislamiento de g-speract por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	24
Separación y aislamiento de los péptidos marcados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	25
Identificación de g-speract mediante espectrometría de masas.....	26
Identificación de cy5-g-speract mediante espectrometría de masas.....	27
Cuantificación de cy5-g-speract.....	31
Cy5-g-speract es específico para su receptor.....	32

Cy5-g-speract sufre un fotoblanqueo rápido.....	32
Aumento de la fotoestabilidad de cy5-g-speract usando sistemas reductores de oxígeno.....	33
Capítulo VI: Discusión de resultados.....	37
Capítulo VII: Conclusión.....	40
Capítulo VIII: Perspectivas.....	41
Bibliografía.....	42

LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Esquema representativo sobre la estructura del espermatozoide de erizo de mar.....	3
2. Cascada de señalización de speract.....	5
3. Diagrama de Jablonski.....	7
4. Esquema representativo de la microscopia de molécula única usando un fluoróforo fotoconvertible.....	11
5. Foto-isomerización de Cy5.....	13
6. Interacción de Cy5 y grupos tioles.....	13
7. Reacción llevada a cabo por el sistema enzimático GOC.....	15
8. Reacción catalizada en el sistema enzimático piranosa-2- oxidasa (POC).....	15
9. Reacción química en el sistema MEA/MB.....	16
10. Cromatograma obtenido de G-speract.....	25
11. Cromatograma obtenido de la reacción de grupos amida primarios.....	26
12. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro de masas correspondiente a G-speract.....	27
13. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente al pico con tiempo de retención 40.464.....	28
14. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente a Cy5-G-speract.....	29
15. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente a Cy5-NHS-ester.....	30
16. Especificidad de Cy5-G-speract por su receptor.....	32
17. Espermatozoide de erizo de mar de <i>L.pictus</i> marcado con Cy5-G- speract.....	33

LISTA DE GRAFICAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Respuesta máxima producida por el espermatozoide de erizo de mar al ser expuesto a distintas concentraciones de G-speract.....	24
2. Precisión de Nanodrop 2000 vs una concentración de referencia.....	31
3. Curva de decaimiento de la intensidad de fluorescencia en espermatozoides de <i>L.pictus</i>	32
4. Curvas del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en distintos medios en espermatozoides de <i>L.pictus</i>	34
5. Comparación de las tasas del fotoblanqueo en distintas condiciones en espermatozoides de <i>L.pictus</i>	34
6. Curvas del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en distintos medios en espermatozoides de <i>S.purpuratus</i>	35
7. Comparación de las tasas del fotoblanqueo en distintas condiciones en espermatozoides de <i>S. purpuratus</i>	35

LISTA DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Concentraciones de speract determinadas en el Nanodrop 2000.....	31
2. Concentraciones de Cy5-G-speract y G-speract determinadas en el Nanodrop 2000.....	31
3. Vida media del fotoblanqueo de los péptidos marcados con Cy5 en <i>L. pictus</i>	36
4. . Vida media del fotoblanqueo de los péptidos marcados con Cy5 en diferentes condiciones experimentales en espermatozoides del erizo de mar <i>S. purpuratus</i>	37

ABREVIATURAS

AMA : Agua de mar artificial.

AMP_c : Adenosín mono-fosfato cíclico.

ATP : Adenosina trifosfato.

Ca_i : Calcio intracelular.

GMP_c : Guanosín mono-fosfato cíclico

GOC: Glucosa oxidasa y catalasa.

HPLC : Cromatografía líquida de alta eficiencia MB: Azul de metileno

MEA: β-mercaptoetilamina.

mM: Milimolar.

nm: Nanómetros

pH_i: pH intracelular.

POC: Piranosa oxidasa y catalasa.

SAP: Péptido activados del espermatozoide

STORM: Microscopía de reconstrucción óptica estocástica.

uM: Micromolar

ESI= Ionización por electrospray TFA: Ácido trifluoroacético

DEDICATORIAS

Principalmente para mis hermanas, para que no se les olvide que si se puede y sigan siempre el camino que su corazón de desee. *Mereces lo que sueñas.*

Y a mis únicos padres Angélica Rodríguez Mújica y Javier Prudenciano Basurto, se que no fue fácil, pero gracias por haberme dado la oportunidad de conocerme, de conocer a tanta gente y de seguir adelante, gracias por tanto esfuerzo y por permitirme estar donde estoy ahora. Al abuelito Ignacio, aunque no este acá se que le debo mucho (casi todo) a usted.

Yanireth gracias por aguantarme y seguirme en el caos que fueron esos años, siempre vas a ser mi hermanita.

Gracias a María de Jesús Mújica Catalán y Xochitl del Carmen Alvarado gracias por haberme proporcionado combustible para mi pequeña ardilla al alimentarme y ayudarme siempre que pudieron.

Daniel *¿Para qué creer en el azar?*, gracias por aparecer al fin.

Y ante todo a Chris, por haberme guiado en algo que parecía interminable, gracias por escucharme, aconsejarme y por mostrarme que soy más capaz de lo que creí y sobre todo por ser un gran amigo.

CAPITULO 1 • INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso que ha sucedido a través de las eras y ha permitido el florecimiento de especies y su descendencia, ésta puede ser asexual o sexual, en la primera la descendencia es producida por un único progenitor y la progenie tiene el mismo material genético, mientras que en la segunda la progenie se deriva de dos progenitores que fusionan su material genético en un proceso conocido como fecundación, para dar lugar a un cigoto.

Existen dos tipos de fecundación sexual, externa e interna, en la fecundación externa la fusión de gametos se lleva a cabo fuera de los progenitores, mientras que la interna es llevada a cabo dentro de uno de ellos, pero en ambos casos se siguen las mismas bases:

1. Ambos gametos deben entrar en contacto y reconocerse.
2. Una vez que el espermatozoide entra, el óvulo lleva a cabo distintas estrategias para evitar la polispermia.
3. El material genético se fusiona.
4. Se activa el metabolismo del cigoto. (*Gilbert, 2005*)

Las estrategias que se han adoptado para lograr el éxito reproductivo dependen de cada especie, en la mayoría de ellas los machos han optado por producir una gran cantidad de espermatozoides y las hembras producen óvulos grandes.

Los invertebrados marinos con fecundación externa pueden producir sustancias químicas que ayudan al espermatozoide a encontrar el huevo (*Lopo & Glabe, 1982*). Estas sustancias químicas son denominadas quimioatrayentes y permiten al espermatozoide guiar sus movimientos con base en su gradiente de concentración, y así encontrar al huevo.

“El éxito durante la fertilización se asegura por medio de distintos pasos que involucran claramente un reconocimiento celular entre el óvulo y el espermatozoide” (*Ohlendieck & Lennarz 1996*), muchos de estos procesos de reconocimiento celular aún son investigados y

especies como estrellas de mar o erizos de mar han sido buenos modelos de estudio para lograr comprender el proceso de fertilización, quimiotaxis y la interacción entre las células involucradas en tales procesos.

1.1 EL ERIZO DE MAR COMO MODELO DE ESTUDIO

Existen aproximadamente 950 especies de erizos de mar que forman a la clase equinoidea perteneciente al filo de los equinodermos. Suelen habitar los océanos en las regiones costeras de mediterráneo y el Atlántico en la zona Oriental, en arrecifes de coral, suelo rocoso no profundo, o profundidades del mar.

Son una especie dioica y tienen cuerpos redondeados rodeados de un esqueleto externo formado por placas de las cuales surgen varias espinas móviles. La boca está ubicada en la parte inferior en la superficie oral (hemisferio oral) y está formada por cinco dientes, el ano se encuentra en la superficie superior (hemisferio aboral).

Poseen cinco gónadas que tienen salida al exterior por gonoporos situados en el hemisferio aboral, por donde se liberan los gametos y en cada liberación pueden producir aproximadamente 10^{12} espermatozoides y 10^7 huevos (*Senbach, 1999*).

Solo se puede diferenciar a la hembra del macho cuando comienzan a liberar los gametos, las hembras liberan una substancia de coloración amarilla mientras que la de los machos tiene una coloración blanquecina.

Los erizos de mar han sido muy utilizados como modelo de estudio de la reproducción sexual con fecundación externa, una de las principales ventajas es que los gametos se pueden obtener fácilmente por medio de una inyección intracelular de KCl 0.5 M a través de la membrana oral, esto junto con la gran cantidad de gametos que se pueden obtener sólo de un erizo de mar y los bajos costos que tiene mantenerlos hacen que sea un buen modelo para estudiar distintos procesos como fecundación, quimiotaxis, movimiento flagelar y fisiología del espermatozoide.

1.2 MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR

El espermatozoide de erizo de mar no suele diferir en cuanto a estructura al espermatozoide humano, sigue manteniendo los mismos componentes básicos: cabeza y flagelo.

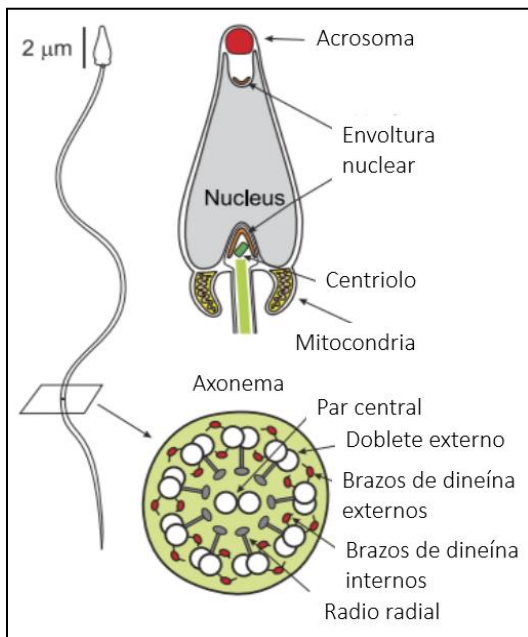


Figura 1. Esquema representativo sobre la estructura del espermatozoide de erizo de mar. Modificado de Darszon et al. 2011.

huevos (Suzuki N, 1995).

Cabeza: El tamaño de la cabeza suele medir entre los 2-5 μm y está compuesta del acrosoma y el núcleo.

El acrosoma es una vesícula que contiene glicoproteínas y enzimas que se encuentran en la punta de la cabeza como glicohidrolasas ácidas, proteasas, esterases y fosfatasas ácidas. Estas enzimas se liberan durante la reacción acrosomal, proceso que comienza con el contacto del espermatozoide con la capa gelatinosa, la liberación de estas sustancias ayuda al espermatozoide a penetrar esta capa gelatinosa hasta la superficie del

En el pronúcleo se encuentra toda la información genética que será transferida. En la pieza intermedia o el cuello del espermatozoide se localiza una sola mitocondria, la cual se encarga de abastecer de energía al espermatozoide para el movimiento flagelar.

Flagelo: El motor del espermatozoide es el flagelo cuyo longitud es aproximadamente de 40 μm y un grosor de 200 nm, su componente básico es el axonema el cual está compuesto por un par de microtúbulos centrales rodeados de otros 9 dobletes de microtúbulos laterales. Además de un grupo de distintas proteínas motoras y reguladoras, que trabajan en conjunto para coordinar el batido flagelar.

CAPITULO 2 • ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 SPERACT Y SU RECEPTOR

El contacto y reconocimiento es un paso vital en el proceso de fecundación y el uso de gradientes de componentes difusibles del huevo para atraer al espermatozoide se ha mantenido en diferentes taxones, en particular en las especies que realizan fecundación externa como los erizos de mar (*Eisenbach, M. 1999*).

En 1928 (*Gray, 1928*) se estimó que las tasas de respiración en espermatozoides de erizo de mar están estimuladas por sustancias relacionados con el huevo de erizo de mar, más tarde esto llevó a la identificación de estas sustancias provenientes del huevo de erizo de mar demostrando que no solo estimulaban la respiración de los espermatozoides, si no también, la movilidad y el metabolismo de ácidos grasos.

Estos componentes difusibles se nombraron péptidos activadores del espermatozoide o SAPs. Garbers y Randall purificaron este péptido de la capa de gelatina del huevo de *Strongylocentrotus purpuratus*, el cual fue denominado speract por su capacidad para activar espermatozoides (*Hansbrough & Garbers 1981*).

La secuencia consenso está formado por los siguientes aminoácidos: G₁-F₂-D₃-L₄-N₅-G₆-G₇-G₈-V₉-G₁₀ y gran parte de su actividad biológica recae cerca de la parte del carboxilo terminal en los aminoácidos Val₉-Gly₁₀ y en la Gly₆, ya que es conocido que modificaciones dentro de estos aminoácidos llevan a la perdida de la actividad biológica (*Cardullo & Herrick, 1994*).

El péptido se une a su receptor ubicado en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, que activa a una guanilato ciclasa de membrana que está asociada al receptor, esto produce guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

El GMPc activa canales de potasio selectivos que conducen a la hiperpolarización de la membrana junto con un aumento del calcio intracelular y del pH intracelular, como resultado se modifica la patrón de nado del espermatozoide lo que permite su reorientación por medio de giros (Darszon et al., 2008).

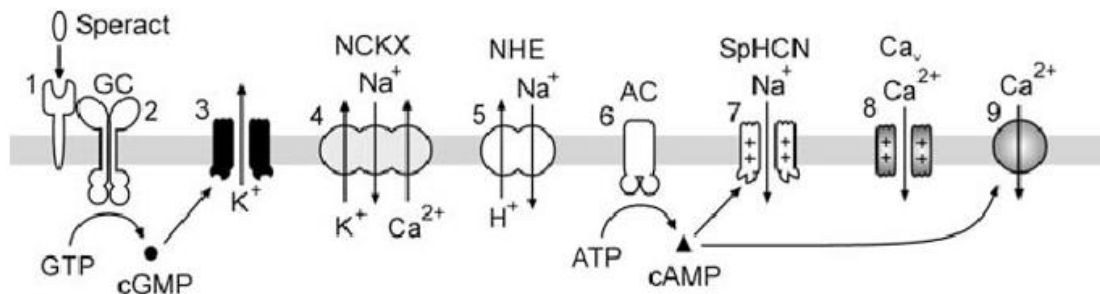


Figura 2. Cascada de señalización de speract. Una vez que se une a su receptor se produce GMPc, que activa canales de K⁺. La salida de K⁺ produce una hiperpolarización de la célula. Esto lleva a la activación de varios canales, intercambiadores, y segundos mensajeros como hiperpolarización activa el intercambiador Na⁺/ H⁺ (NHE) que aumenta el pH intracelular, que lleva al aumento del pH intracelular y cambios en el potencial de membrana. Imagen tomada y modificada de Darszon et al, 2005.

La unión de speract a su receptor es considerado un evento esencialmente irreversible, mientras que la afinidad del receptor aumenta con el incremento del pH intracelular ya que provoca cambios conformacionales que incrementa la afinidad del receptor.

El receptor de speract no ha podido ser cristalizados, sin embargo, se sabe que es una glicoproteína transmembranal de 77kD formado por una única cadena de polipéptido (Dangott & Garbers, 1987), que posee tres partes esenciales: una región extramembranal formada por el dominio amino terminal con gran porcentaje de cisteínas, una región transmembranal cerca del extremo c terminal, y la intracelular (Dangott et al., 1989).

El número de sitios de unión en una célula espermática varía dependiendo de la especie: aproximadamente 20,000 para *Strongylocentrotus purpuratus*, y 60,000 para *Lytechinus pictus* (Nishigaki et al., 2001).

En 1994 Richard A. Cardullo utilizó isotiocianato de fluoresceína (FITC) unido a un análogo de speract radiomarcado (FITC-GGG[Y2]-speract) y microscopia de epifluorescencia para conocer la localización del receptor (Cardullo & Herrick, 1994), concluyó que la ubicación del receptor se

confinaba solamente en el flagelo del espermatozoide, lo cual reforzaba el papel del receptor en la motilidad de este.

En 2001 speract se unió directamente a fluoresceína y rodamina, el péptido marcado presentaba un apagamiento de la fluorescencia al unirse al receptor, cualidad que fue utilizada para obtener constantes y valores relacionados con la cinética e interacción del ligando-receptor (*Nishigaki et al., 2001*).

Una distribución más detallada del receptor se dio utilizando proteínas fluorescentes unidas a speract mediante un espaciador de siete aminoácidos formado por Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly. Este diseño experimental junto con la técnica de FRET (Transferencia de la energía de Förster Resonancia), tuvo dos hipótesis explicativas, la primera es que el receptor forma agrupaciones en la superficie de membrana flagelar, y en la segunda el receptor tiene múltiples sitios de unión para speract (*Arcos-Hernandez et al., 2016*).

Estos resultados son consistentes con investigaciones anteriores, en las cuales se utiliza centrifugación por gradientes de sacarosa para separar distintas fases de la membrana lipídica y anticuerpos contra el receptor de speract. Durante estos experimentos se concluyó que al menos una fracción del receptor se encuentra localizado en fases de membrana ricas en colesterol y esfingolípidos mejor conocidos como balsas lipídicas (*Ohta et al., 2000*).

La compartimentalización en dominios nanométricos ricos en colesterol y esfingolípidos ha demostrado ser críticos para la comunicación ovulo-espermatozoide en espermatozoides de mamíferos, por lo que no se puede evadir la hipótesis de que la organización del receptor de speract tenga repercusiones en la comunicación huevo -espermatozoide.

2.2 SOBRE FLUOROFOROS Y FLUORESCENCIA

Como hemos mencionado el camino que se ha utilizado para conocer más sobre la interacción del péptido speract y su receptor ha sido el uso de microscopia de fluorescencia y moléculas fluorescentes, tales moléculas fluorescentes nos permiten examinar procesos in vivo que suceden dentro o sobre la superficie de las células por lo que entender cómo funcionan es vital para cualquier investigación dentro del área.

Los fluoróforos son moléculas capaces de absorber fotones por medio de la irradiación con luz y producir fluorescencia, están presentes de forma natural en algas, plantas, peces y medusas, también se tienen fluoróforos artificiales como lo son las variantes de Alexa Fluor, derivados de cumarina y cianinas entre otros (Jameson, 2014).

Dentro de los fluoróforos tenemos tres grupos principales que se utilizan en microscopia de fluorescencia: puntos cuánticos, proteínas y colorantes fluorescentes, cualquiera de estos sigue un comportamiento explicado con el diagrama de Jablonski (Figura3).

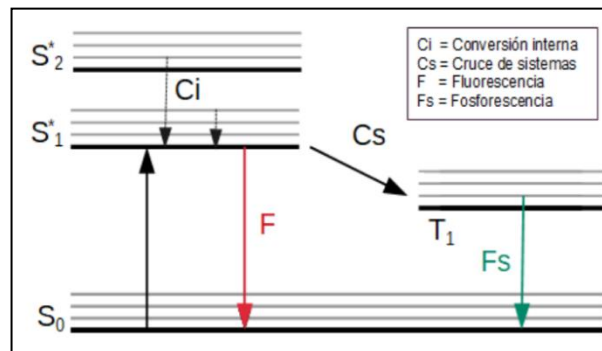


Figura 3. Diagrama de Jablonski. Representación de los posibles estados que puede habitar un fluoróforo cuando es excitado

Los fluoróforos suelen encontrarse en un estado basal denominado singlete S_0 , al ser excitados con luz se alcanza un estado electrónico excitado de mayor energía S_1 o S_2 , dentro de los estados singlete excitados existen niveles vibracionales que describen el estado vibracional de la molécula.

Parte de la energía que ha sido transferida a la molécula se disipa, lo cual lleva a un nivel vibracional inferior del estado excitado en un fenómeno conocido como conversión interna y que sucede aproximadamente en el rango de picosegundos (10^{-14} y 10^{-11} segundos).

Cuando el fluoróforo regresa al estado basal (S_0) se libera un fotón esto es lo que denominamos fluorescencia, sin embargo, la energía del fotón emitido es menor que la del fotón que excito al fluoróforo, debido a que parte de la energía se pierde en procesos como el descrito anteriormente (conversión interna). La fluorescencia es un proceso que dura de 10^{-9} a 10^{-7} segundos y permite a la molécula regresar al estado basal S_0 liberando energía en forma radiativa.

Por otro lado, la fosforescencia es un proceso en el cual el electrón excitado entra a un estado denominado triplete, a diferencia de la fluorescencia donde los spines del electrón excitado están apareados en el estado triplete los spines se encuentran paralelos ($\uparrow\uparrow$), para que el electrón regrese nuevamente a un estado basal debe suceder la inversión del spin, por lo que el tiempo en que tarda en regresar es mayor estimado entre micro-mili segundos (*Toseland, C. & Fili, N., 2016*)

Algunas de los fluoróforos más utilizados para estudios en células vivas han sido las proteínas y colorantes fluorescentes, cada uno de ellos presenta ventajas diferentes dependiendo del problema de estudio.

- **Coefficiente de extinción:** Es una medida de la capacidad que tienen los fluoróforos para absorber fotones y excitarse a un nivel de energía mayor, y es específica para cada fluoróforo. Altos coeficientes de extinción significan una alta probabilidad de absorción de la energía fotónica.
- **Rendimiento cuántico:** Nos permite saber cuál es la relación de los fotones emitidos respecto a los absorbidos, es decir, de todos los fotones que son absorbidos por el fluoróforo cuantos de ellos lograran emitirse en forma de fluorescencia. Los fluoróforos con valores de rendimiento cuantifico cercanos a 1 son más eficientes ya que la mayoría de los fotones que se absorben son emitidos.

- **Brillo del fluoróforo:** El brillo del fluoróforo es una propiedad definida por el rendimiento cuántico y el coeficiente de extinción, los fluoróforos con un alto coeficiente de extinción y un alto rendimiento cuántico poseen un brillo alto, lo que significa una intensidad de fluorescencia mayor o una señal más grande (*Toseland, et al, 2016*).
- **Cambio de Stokes:** Los fluoróforos tienen longitudes de onda específicas a las cuales son excitados, y longitudes de onda en las cuales se emiten los fotones, la diferencia que existe entre los picos de excitación y emisión es conocida como cambio de Stokes. Esta propiedad se ve afectada por la estructura de la molécula fluorescente, cambios de Stokes pequeños representan picos de emisión y excitación cercanos, mientras más grande el cambio de Stokes más alejado se encuentran los picos de emisión y excitación, por lo que es un factor útil que tomar en cuenta cuando se trabaja con más de un fluoróforo.
- **Vida media fluorescente:** Representa el tiempo promedio en el cual el fluoróforo se mantiene en un estado excitado antes de emitir un fotón (*Toseland, et al, 2016*), su valor es calculado a partir de los valores de las tasas de fluorescencia y conversión interna.
- **Fotoestabilidad:** La fotoestabilidad es la capacidad que tiene un fluoróforo para resistir el fotoblanqueo (destrucción irreversible del fluoróforo) que provoca la pérdida irreversible de la fluorescencia. El principal camino hacia el fotoblanqueo es la fotooxidación, en la cual especies reactivas de oxígeno se forman de la interacción del oxígeno molecular con el estado triplete excitado del fluoróforo.

Los fluoróforos poco fotoestables llevan a una emisión pobre de fotones por la consecuencia del fotoblanqueo, lo cual da como resultado una disminución en la resolución espacial y temporal de las imágenes adquiridas con microscopios (*Zheng, Q et al, 2013*). Las propiedades fluorescentes de ciertas moléculas se han explotado ampliamente en el ámbito científico en específico en la microscopía.

2.3 MICROSCOPIA DE SUPER RESOLUCION PARA RESOLVER ESTRUCTURAS CELULARES

La invención del microscopio óptico impulsó muchas áreas de la investigación científica. Hasta un poco antes de su aparición en el siglo XVI la mayoría de los conceptos científicos no estaban bien consolidados ni estudiados, ya que mucha de la investigación se veía limitada por lo que podíamos percibir y como sabemos la vida se desarrolla a niveles imperceptibles por el ojo humano.

El desarrollo de un artefacto que nos permitiera observar más allá de nuestras capacidades humanas provocó una revolución en el conocimiento. Sin embargo, el uso del microscopio en el estudio de procesos subcelulares se vio restringido por el límite de resolución.

El límite de resolución se ve impuesto por las propiedades de difracción de la luz, así como del sistema óptico, además las estructuras que se encuentren por debajo de los 200 nm son imposibles de resolver. La búsqueda de conocimientos sobre procesos que ocurren a escalas nanométricas como la producción de proteínas, difusión de moléculas o sobre la estructura de distintos componentes celulares como filamentos intermedios, receptores o canales, dio lugar al florecimiento de combinaciones de técnicas microscópicas con algoritmos lo que permitió la aparición de la microscopía óptica de súper resolución.

Podemos dividir estas técnicas en tres grupos:

- Microscopía del agotamiento de la emisión estimulada (STED).
- Microscopía de iluminación estructurada (SIM).
- Microscopía de localización de moléculas únicas (SMLM).

Dentro de la microscopía de localización única existen muchas técnicas una de las más utilizadas es la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM). Esta técnica permite la localización de moléculas únicas y la reconstrucción por medio de algoritmos, se basa en la conmutación de ciertos fluoróforos, es decir, la capacidad para entrar y salir de un estado donde se emite fluorescencia, por medio de la exposición a ciertas longitudes de onda de luz visible.

Los fluoróforos marcan la región de interés, después un pulso de luz activa ciertos fluoróforos en el área, produciendo fluorescencia, y luego se induce a un estado no fluorescente, este proceso se repite muchas veces, de manera que, en cada ciclo una parte de los fluoróforos permanece oscuros y unos cuantos se activan aleatoriamente.

Este ciclo se repite múltiples veces hasta que se obtiene un conjunto de imágenes donde existe una separación espacio temporal con coordenadas de la estructura de interés, y con ayuda de distintos algoritmos se puede reconstruir la imagen con una gran precisión (Mondal P. 2016).

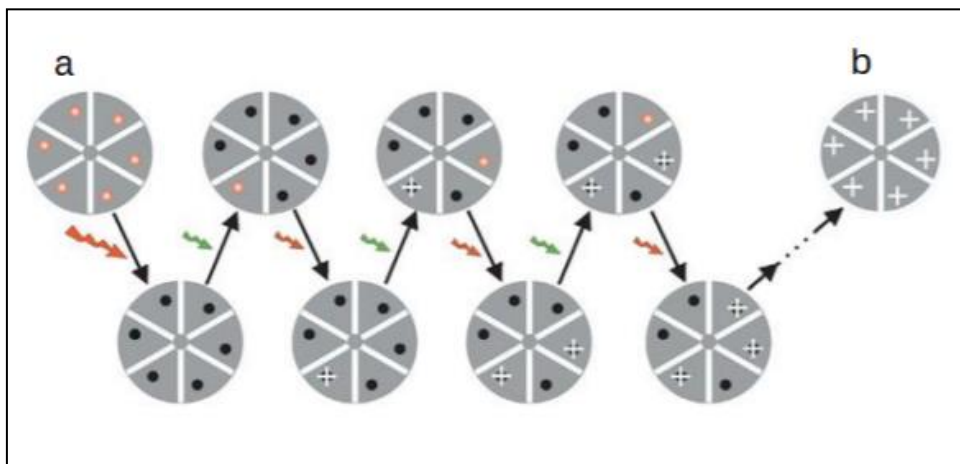


Figura 4. Esquema representativo de la microscopía de molécula única usando un fluoróforo fotoconvertible. Mediante un pulso de luz roja se induce a los fluoróforos a un estado oscuro, a continuación, se irradia con luz verde para activar solo unos pocos fluoróforos los cuales se localizan, este proceso se repite durante numerosos ciclos (a) hasta obtener un compilado de imágenes donde fluoróforos no superpuestos emiten creando una separación espacio temporal, que permite obtener coordenadas y realizar un reconstrucción de la estructura que se observa (b). (Imagen tomada de Rust & Bates, 2006)

Para poder localizar emisores de molécula única varios aspectos deben tomarse en cuenta:

I. La elección del fluoróforo

Elegir correctamente el fluoróforo es esencial para la microscopía de moléculas únicas, un fluoróforo altamente foto-estable nos permite un mayor tiempo de muestreo y más información acerca de la estructura de estudio.

Es también necesario que se registre una gran cantidad de fotones para lograr una gran precisión en la localización de las moléculas únicas, por lo que la fotoestabilidad y el rendimiento cuántico afectan la calidad de las imágenes obtenidas.

Uno de los colorantes fluorescentes más utilizados en la microscopia STORM y con el que debuto por primera vez esta técnica fue Cy5.

Cy5 posee un máximo de excitación cerca de los 649 nm y emite en el infrarrojo (666 nm), lo cual es útil ya que no coincide con la auto fluorescencia de fondo las células. Es una molécula plana formada por un sistema de anillos conjugados que además presenta grupos dimetilo lo cual ayuda a evitar la apilación de las moléculas (*Fluorescent Indocyanines for Color-Coded Surgery 2018*), esto es beneficioso ya que se sabe que la agregación de colorantes conlleva a una transferencia de energía que puede provocar un disminución en el brillo de la sonda y el apagamiento de la fluorescencia (*Zhegalova & He 2014*).

Al tener enlaces C-C libres en la cadena de polimetina Cy5 es capaz de transformarse a sus isómeros cis y trans por rotación alrededor de estos enlaces donde la forma *cis* del colorante es débilmente fluorescente mientras que la forma *trans* es fluorescente, lo cual le permiten fluctuar entre estados fluorescentes y no fluorescentes (parpadeo) (*Widengren & Schwille, 2000*).

El isómero *trans* es el que se encuentra mayormente en una solución con Cy5, mientras que isómero *cis* es formado después de excitar al fluoróforo, la tasa a la que ocurre esta fotoisomerización depende de factores como la temperatura, viscosidad del solvente, así como restricciones estéricas. A su vez el estado no fluorescente puede revertirse por medio de pulsos de luz verde (*Stennett, Ciuba & Levitus, 2014*).

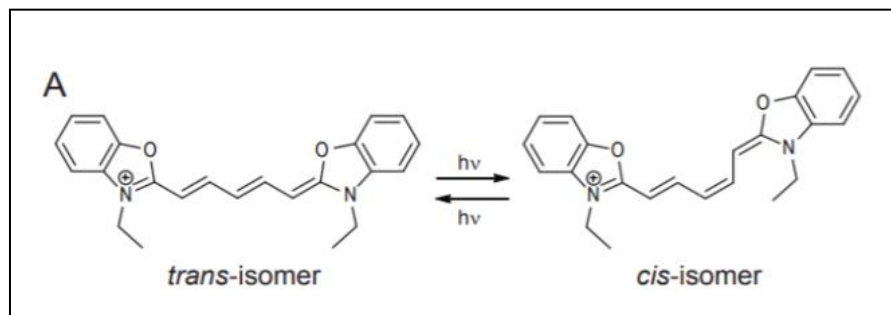


Figura 5. Fotoisomerización de Cy5. Transición reversible entre los isómeros *cis* y *trans* de Cy5 Imagen tomada y modificada de Texier et al,2019

Por otro lado, el uso de agentes que contengan grupos tiol primario sirve para controlar el parpadeo de Cy5, los grupos tioles interfieren con los puentes de polimetina lo cual interrumpe

la conjugación de los enlaces induciendo así a un estado oscuro el cual puede ser interrumpido con pulsos de luz UV (Figura 5).

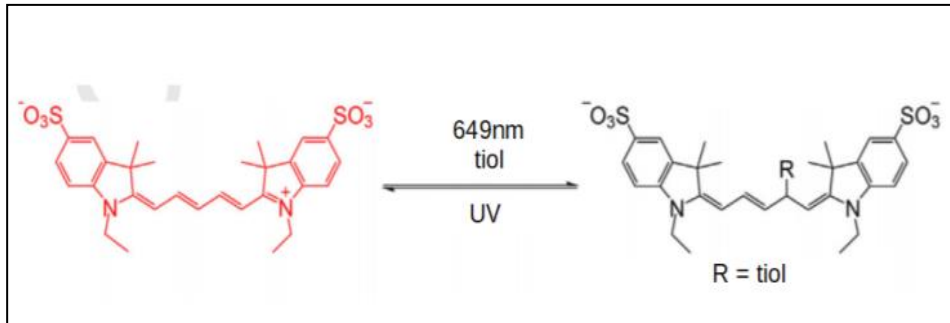


Figura 6. Interacción de Cy5 y grupos tioles. Cy5 excitado puede entrar a un estado oscuro por medio de la adición de compuestos con grupos tioles primarios los cuales forman un aducto en el enlace de polimetina, esa unión es reversible por medio de pulsos de luz UV. Imagen tomada y modificada de Dempsy et al,2010.

Entre las principales características que convierten a Cy5 un fluoróforo útil para microscopía de súper resolución son:

1. Posee un alto número de fotones emitidos por molécula fluorescente aproximadamente 6000.
2. Pueden experimentar más de 200 ciclos de conmutación antes del fotoblanqueo.
3. La frecuencia de formación de estados triplete es baja.

Sin embargo, la principal desventaja es la alta tasa de fotoblanqueo que posee, que puede mejorarse con el uso de sistemas reductores de oxígeno o agentes antioxidantes.

II. Buffers

El principal problema que se enfrenta cuando se trabaja con fluoróforos es el fotoblanqueo en el cual existe una destrucción del fluoróforo, es un proceso inminente y el tiempo en que un fluoróforo dure emitiendo antes de su destrucción completa varía dependiendo en gran parte de propiedades intrínsecas, del medio ambiente o las condiciones de excitación.

El principal camino hacia el fotoblanqueo es la fotooxidación en la cual especies reactivas de oxígeno mejor conocidas como oxígeno singlete interactúan con el fluoróforo, provocando la oxidación o degradación de este.

Por otro lado, el oxígeno molecular puede presentar beneficios en el parpadeo de los fluoróforos, ya que al interactúa con los estados triplete de los fluoróforos reduciendo el tiempo que el fluoróforo pasa en este estado no emisor.

Para equilibrar ambos efectos se usan combinaciones de distintos compuestos algunos de los cuales disminuyen la cantidad de oxígeno del medio y otros que permiten reducir el tiempo en estado triplete, lo que permite disminuir el fotoblanqueo y las tasas de parpadeo.

Los sistemas enzimáticos son los más utilizados ya que nos permiten disminuir la cantidad de oxígeno en el medio en cuestión de minutos, y mantener el estado de hipoxia del medio, entre los distintos sistemas enzimáticos tenemos tres principales:

1. **Sistema GOC:** Es un sistema enzimático que utiliza como sustrato β -D-glucosa para captar el oxígeno del medio con ayuda de la glucosa oxidasa, durante el proceso se produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, con ayuda de la catalasa se puede descomponer en agua y oxígeno teniendo como resultado neto la pérdida de oxígeno. Uno de los principales inconveniente es que debido a la producción continua de ácido glucónico el pH decae a lo largo del tiempo lo cual puede afectar las condiciones experimentales y el parpadeo del fluoróforo, sin embargo, el tiempo de catálisis de la reacción es muy rápido (Swoboda, M., & Henig, J. 2012).

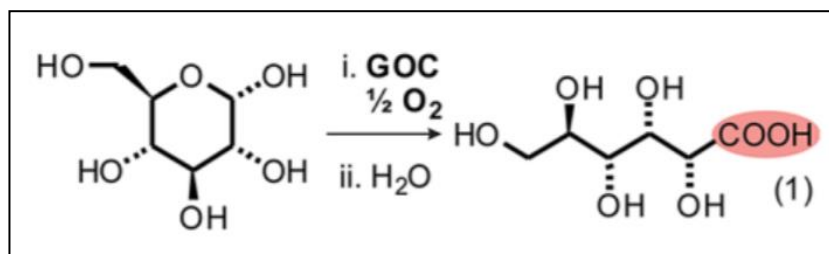


Figura 7. Reacción llevada a cabo por el sistema enzimático GOC. En el primer paso (i) la enzima glucosa oxidasa transforma la β -D-glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno que posteriormente es transformado en agua (ii) con ayuda de la enzima catalasa. Imagen tomada de Swoboda & Henig, 2012.

2. **Sistema enzimático POC** : En este sistema también utiliza como sustrato la β -D-glucosa, sin embargo la reacción es catalizada por la enzima piranosa-2-oxidasa, y da como producto 2-ceto-D-glucosa y peróxido de hidrogeno, este último al igual que en el sistema GOC es eliminado por la enzima catalasa, en forma de agua y oxígeno.

Como producto final obtenemos una cetona por lo cual no se acidifica el medio además el producto de la oxidación no afecta a las biomoléculas. Pese a ser el sistema enzimático que presenta una mayor estabilidad en el pH a lo largo del tiempo tiene una menor actividad específica (Swoboda & Henig, 2012).

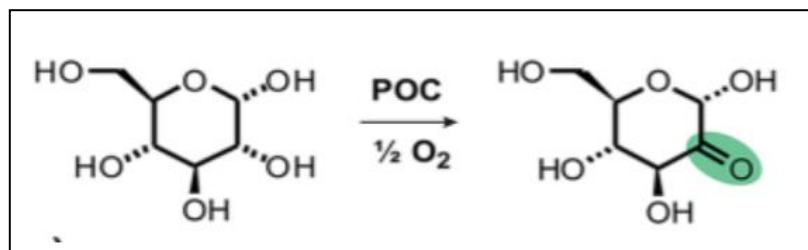


Figura 8. Reacción catalizada en el sistema enzimático piranosa-2- oxidasa (POC). La enzima piranosa oxidasa oxida la β -D-glucosa en 2-ceto-D-glucosa y peróxido de hidrógeno que posteriormente es transformado en agua con ayuda de la enzima catalasa. Imagen tomada de Swoboda & Henig, 2012.

3. **Sistema MEA/MB**: Es un sistema no enzimático formado por β -mercaptoetilamina y azul de metileno. La β -mercaptoetilamina (MEA) por si misma es usado como un antioxidante que reduce el oxígeno del medio de muestreo, además posee un grupo tiol que puede donar electrones y atenuar el estado triplete ayudando a controlar los estados encendido/apagado del fluoróforo (Schäfer & van de Linde, 2013).

El azul de metileno en presencia de un agente reductor puede transformarse en su base conocida como leuco MB y convertirse nuevamente en MB consumiendo oxígeno molecular. En el sistema MEA/MB la β -mercaptoetilamina funciona como agente reductor para transformar el MB a MBH, y la presencia del MEA disminuye el tiempo para agotar el oxígeno del medio (Figura 9).

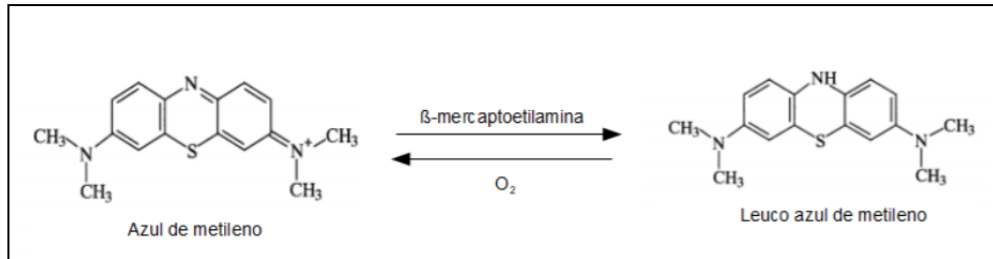


Figura 9 . Reacción química en el sistema MEA/MB. Imagen tomada y modificada de Schäfer & van de Linde, 2013

III. Densidad de etiquetado

Gran parte de la resolución del método STORM, está basada en una separación espacio temporal, que es lograda gracias a la activación aleatoria de unos cuantos fluoróforos que, aunque están cercanos no se superponen.

Si la densidad del etiquetado es muy alta, existe una mayor probabilidad estocástica de que dos fluoróforo vecinos se activen simultáneamente, por lo que será difícil distinguir entre dos fuentes puntuales únicas y la reconstrucción es ineficiente, si la densidad es baja la información obtenida no es suficiente para poder reconstruir la imagen (Strack, R. 2015).

CAPÍTULO 3 • HIPÓTESIS, OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El receptor speract es el primer paso en la cadena de señalización que lleva a cabo las respuestas quimiotácticas dentro del espermatozoide y al movimiento flagelar, no se sabe más que unos cuantos datos sobre su estructura flagelar. En cuanto a su organización sólo se han ofrecido pocas respuestas, como que se ubica en la membrana flagelar en nano dominios lipídicos y forma agrupaciones. Describir a profundidad estas agrupaciones podría aportar información sobre el receptor y la manera en que actúa y corroborar la información existente.

3.2 JUSTIFICACIÓN

El estudio propuesto podría no sólo ratificar la ubicación del receptor, si no también describir la forma y el tamaño de los clúster. Además, la descripción de la distribución del receptor ofrecerá información sobre la relación entre ubicación del receptor y su función en el movimiento del espermatozoide.

3.3 HIPÓTESIS

Los receptores del péptido speract se encuentran distribuidos en la membrana flagelar en balsas lipídicas con dimensiones en la región de 100 a 150 nm.

3.4 OBJETIVOS

General:

- Describir la distribución del receptor speract.

Particulares:

- Marcar speract con colorantes fluorescentes sin afectar su actividad biológica.

- Realizar experimentos de súper resolución.
- Optimizar las condiciones experimentales utilizando distintos secuestradores de oxígeno

CAPÍTULO 4 • METODOLOGÍA

Como se mencionó en los antecedentes el uso de espaciadores en speract elimina el apagamiento de la fluorescencia provocado por la unión directa del fluoróforo al péptido (*Nishigaki & Darszon, 2000*) por lo que optamos por agregar cinco aminoácidos extra al inicio que funcionaran como espaciador, el péptido se denominó G-speract, con la secuencia GGSGGGFDLNGGGVG.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE G-SPERACT

Carga con el indicador FLUO4-AM

Los espermatozoides secos se obtuvieron de *L. pictus*, mediante inyección intercelómica de KCl 0,5 M y se almacenaron en hielo. Los espermatozoides se cargaron según la literatura (*Wood et al, 2003*) 40 uL de espermatozoides fueron diluidos en 400 uL de agua de mar artificial pH 7, junto con 15 uL de plurónico F-127 al 10%, 6uL de Fluo-4 AM 1mM e incubados durante 3 hrs a 16°C. Después de ese tiempo se agregó 1uL de AMA (pH 7) y se centrifugaron a 1000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 400uL de AMA (pH 7), se guardaron en obscuridad y hielo hasta su uso.

Espectrofluorimetría

Los cambios en la concentración de calcio intracelular fueron determinados usando Fluo 4 AM como sonda, distintas concentraciones de G-speract fueron añadidas a la cubeta que tenía espermatozoides cargados y AMA (pH 8), el cambio en la emisión de la fluorescencia fue grabado durante 2 minutos utilizando un espectrofluorímetro SLM8000 modificado por Olis Global Works Software.

4.2 ETIQUETADO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CY5-GSPERACT

Etiquetado de G-speract con Cy5

El péptido análogo fue marcado utilizando un kit de marcaje de grupos amida primarios de Jena Bioscience, se agregaron 10 uL de bicarbonato de sodio 1M, 3.5uL de G-speract 10mM, junto con 10 uL de Cy5-NHS-ester (10 mg/mL), todo fue diluido en 76.5uL de PBS pH 7.4, la mezcla fue protegida de la luz e incubada durante toda la noche a 4°C.

Separación de la mezcla de péptidos por medio de HPLC

Las separaciones por HPLC se realizaron usando un sistema Waters 1525 Binary HPLC Pump . La solución A estaba formado por agua miliQ y TFA (0.12%), y la solución B por acetonitrilo y TFA (0.1%). De 25-30 µl de muestra fueron inyectadas usando una válvula y pasaron a través de una columna C18 de marca VYDAC de 4.6 x 25 milímetros y se usó un detector de longitud de onda variable modelo 2489 establecido a 230 nm. Los picos recolectados fueron a espectrometría de masas un espectrómetro de masas de trampa iónica Thermo Scientific™LCQ Fleet™ fue utilizado y la masa de las fracciones se determinó utilizando ionización por electrospray (ESI).

4.3 EXPERIMENTOS DE SÚPER RESOLUCIÓN

Preparación y obtención de la muestra

Espermatozoides secos fueron obtenidos por medio de inyección intercelómica de KCl 0.5M y se mantuvieron en hielo hasta su uso. 4 uL de espermatozoides secos fueron diluidos en AMA pH 7 para mantener un estado quiescente, para activarlos 15 µL de estos espermatozoides fueron diluidos en 200 µL de AMA pH 8, y se agregó una concentración final de 10 nm de Cy5-Gsperact cuando se trabajó con espermatozoides de *L.pictus*, y una concentración de 50 nm cuando se trataba de espermatozoides de *S.purpuratus*. Una vez cargados con el péptido se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con Poli-L-lisina al 10%.

Microscopia TIRF

Las primeras pruebas del marcaje de Cy5-G-speract se hicieron en un microscopio Olympus IX81 TIRF, los espermatozoides se observaron usando un objetivo de inmersión de aceite de 100x con una lente de magnificación de 1.6 x. La excitación se realizó por medio de un láser de longitud de onda de 647 nm y una potencia de 200 μ W, utilizando un tiempo de exposición de 10 milisegundos y un filtro de densidad neutra.

4.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES UTILIZANDO DISTINTOS SISTEMAS REDUCTORES DE OXÍGENO

Sistema enzimático GLOX

En el caso del sistema enzimático GLOX se agregó a la cámara una concentración final de 192 U/mL de glucosa oxidasa, 90 U/ml de catalasa y 24 mM de glucosa, se selló la cámara e inmediatamente se procedió a realizar el muestreo.

Sistema enzimático POC

Para el sistema enzimático POC las concentraciones finales utilizadas fueron 3 U/ml de piranosa oxidasa y 24 mM de glucosa, la cámara fue sellada y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente antes de comenzar el muestreo.

Sistema MEA/MB

Para el sistema no enzimático una concentración de 5 mM de MB fue agregado a un tubo falcón con agua de mar artificial junto con 50 μ M de 2-mercaptoetilamina, se protegió de la luz y se dejó incubar durante 30 minutos a 16°C, posteriormente el buffer tratado fue agregado a las cámaras, sellado y se procedió a realizar el muestreo.

Microscopia confocal

Para estudiar el efecto de los sistemas reductores de oxígeno sobre la vida media del fotoblanqueo de Cy5-G-speract se utilizó microscopia confocal de disco giratorio modelo Mariana (Intelligent Imaging Innovations). Para la excitación de la muestra se utilizó un láser con

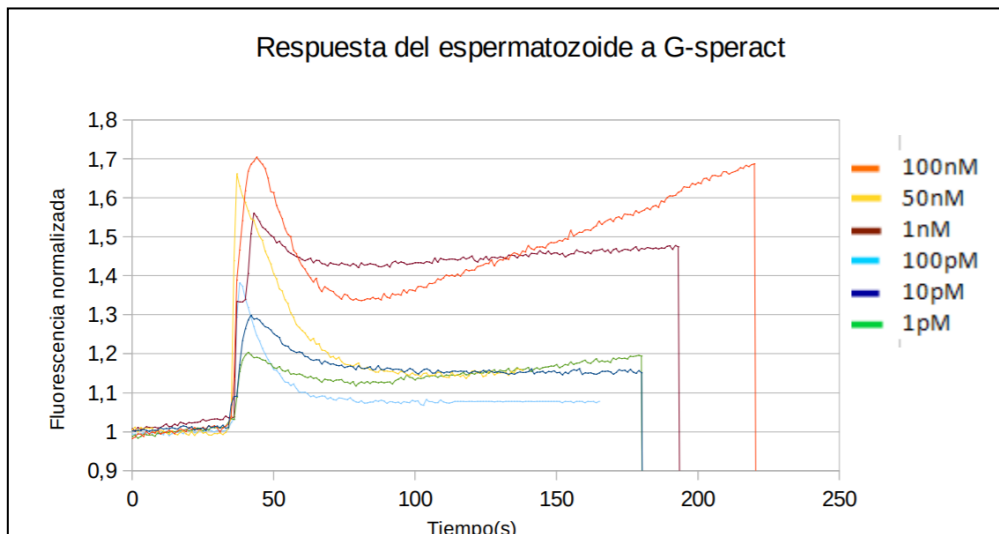
longitud de onda 640 nm con un objetivo de inmersión en aceite 100x y una apertura numérica de 1.4. Durante la adquisición de las imágenes se utilizó una cámara EMCCD Andor Ixon 897, el tiempo de exposición fue de 100 ms, con una intensificación de 70, y un bin de 2 x 2.

CAPÍTULO 5 • RESULTADOS

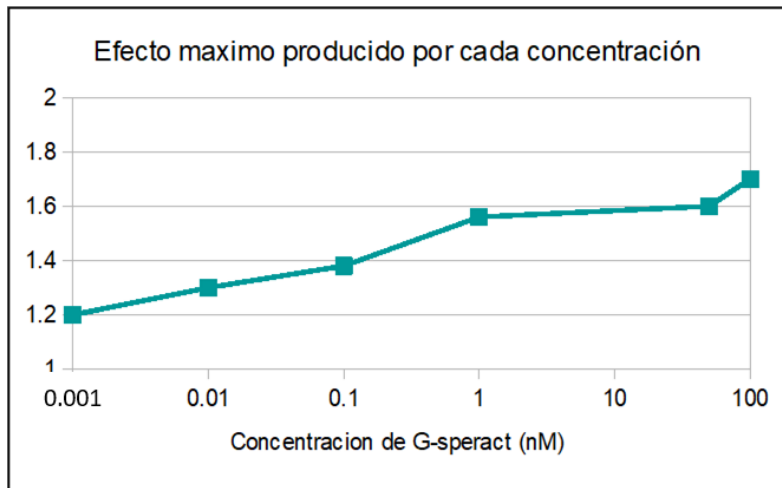
5.1 RESPUESTA DEL ESPERMATOZOIDE A G-SPERACT

El aumento de calcio intracelular por la unión de speract a su receptor es una respuesta bien caracterizada y altamente sensible (*Wood et al 2003*), por lo que para corroborar la si el péptido análogo (G-speract) induce respuesta biológica en el espermatozoide de erizo de mar, se usó un indicador de calcio fluorescente (Fluo4-AM), y se midió el cambio en la intensidad de la fluorescencia en presencia de G-speract.

En la gráfica 1 observamos emisión de fluorescencia de la sonda fluo4-AM, incluso a concentraciones pico-molares de G-speract. Esto indica que G-speract es capaz de inducir respuesta del espermatozoide. De la misma manera al aumentar la concentración de G-speract aumenta la respuesta en el espermatozoide (gráfica 2).



Gráfica 1. Respuesta del espermatozoide a G-speract. Se utilizaron concentraciones decrecientes de G-speract desde nanomolar a picomolar, para cada experimento G-speract se agregó ente el segundo 45 a 49.



Gráfica 2. Respuesta máxima producida por el espermatozoide de erizo de mar al ser expuesto a distintas concentraciones de G-speract.

5.2 SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE G-SPERACT POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA(HPLC)

El aislamiento del péptido marcado se realizó por medio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de fase reversa en una columna C18 de 4.6 x 25 milímetros. Ésto nos permite separar moléculas con base en su hidrofobicidad.

En la Figura 10, observamos la cromatografía en fase reversa del péptido G-speract, el pico mayor con tiempo de retención de 31.549 min corresponde a G-speract. Una vez obtenido el pico se llevó a espectrometría de masas para confirmar la presencia de G-speract.

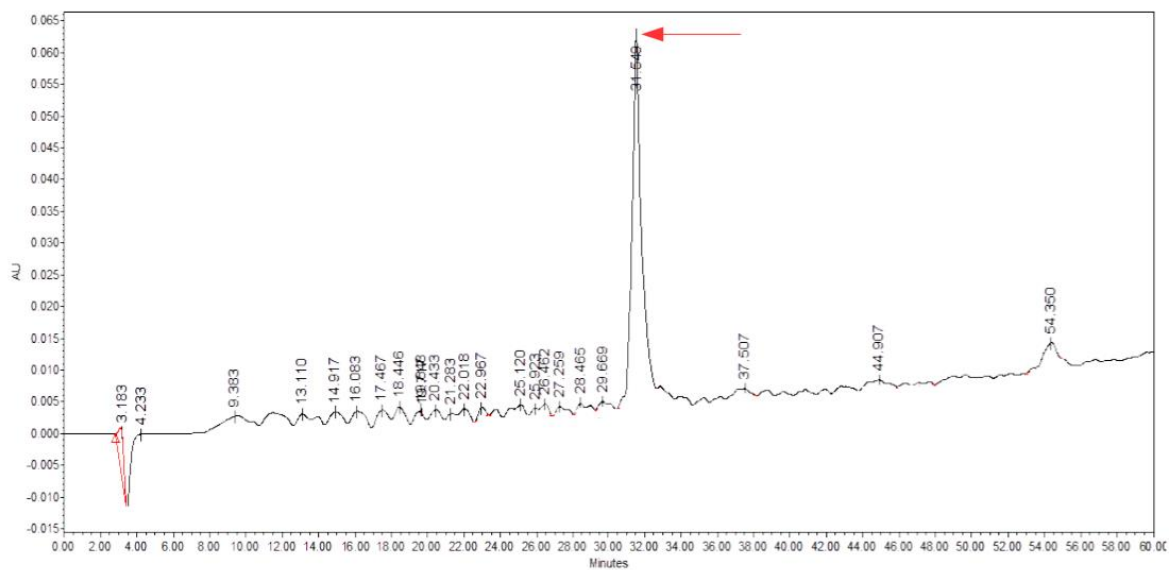


Figura 10. Cromatograma de G-speract. La flecha roja indica la fracción correspondiente a G-speract

5.3 SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS MARCADOS POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA(HPLC).

Los péptidos marcados con Cy5 fueron aislados de otros componentes de la reacción por medio de HPLC, se muestran varias fracciones, sin embargo, solo las fracciones con el tiempo de retención más largo (40.113, 41.344 y 43.923 minutos) fueron recolectados y analizados por espectrometría de masas.

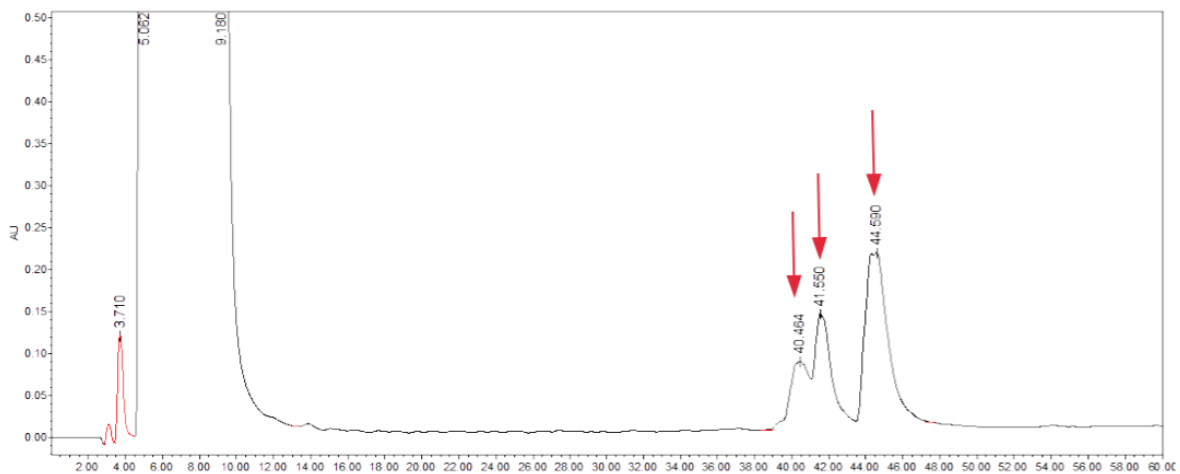


Figura 11. Cromatograma de los compuestos presentes en la reacción de etiquetado de G-speract con Cy5. Las flechas rojas indica las fracciones que se recolectaron y se llevaron a espectrometría de masas.

5.4 IDENTIFICACIÓN DE G-SPERACT MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas permite identificar compuestos con base en la relación masa/carga (m/z), por lo que las fracciones recolectadas, así como el péptido puro (G-speract) fueron analizados con esta técnica. En la figura 12 encontramos el espectro de masas correspondiente a G-speract, el pico mayor se señala con la flecha roja y corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar.

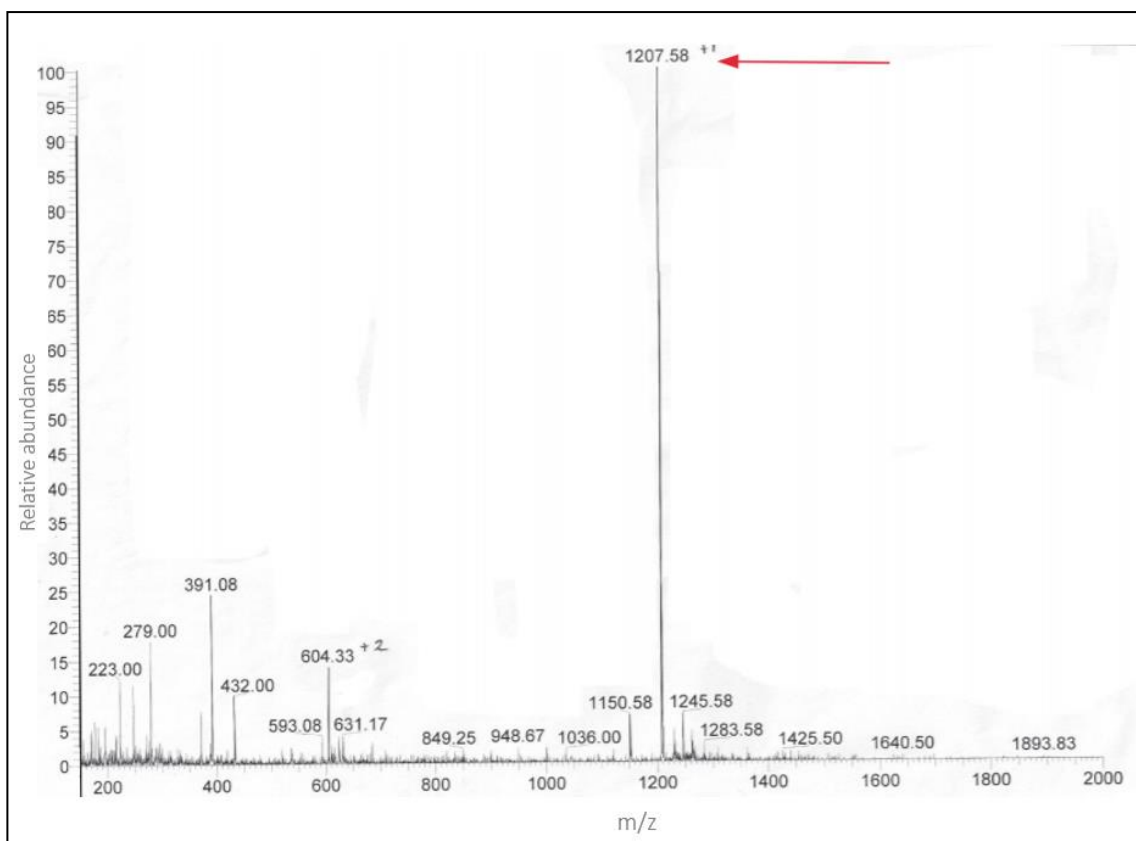


Figura 12. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro de masas correspondiente a G-speract. La flecha roja indica el peso de molecular. La masa esperada de G-speract es 1207.21 g/mol

5.5 IDENTIFICACIÓN DE CY5-G-SPERACT MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la figura 13 encontramos el espectro de masas correspondiente a la fracción con tiempo de retención 40.464 min, la figura 14 (tiempo de retención 41.550 min) corresponde al espectro de masas de Cy-5-Gsperact donde existe la presencia de dos iones, mientras que la figura 15 (tiempo de retención 43.923 min) representa el espectro de masas de Cy5-NHS éster. En todos los casos el pico mayor está señalado con la flecha roja y corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar.

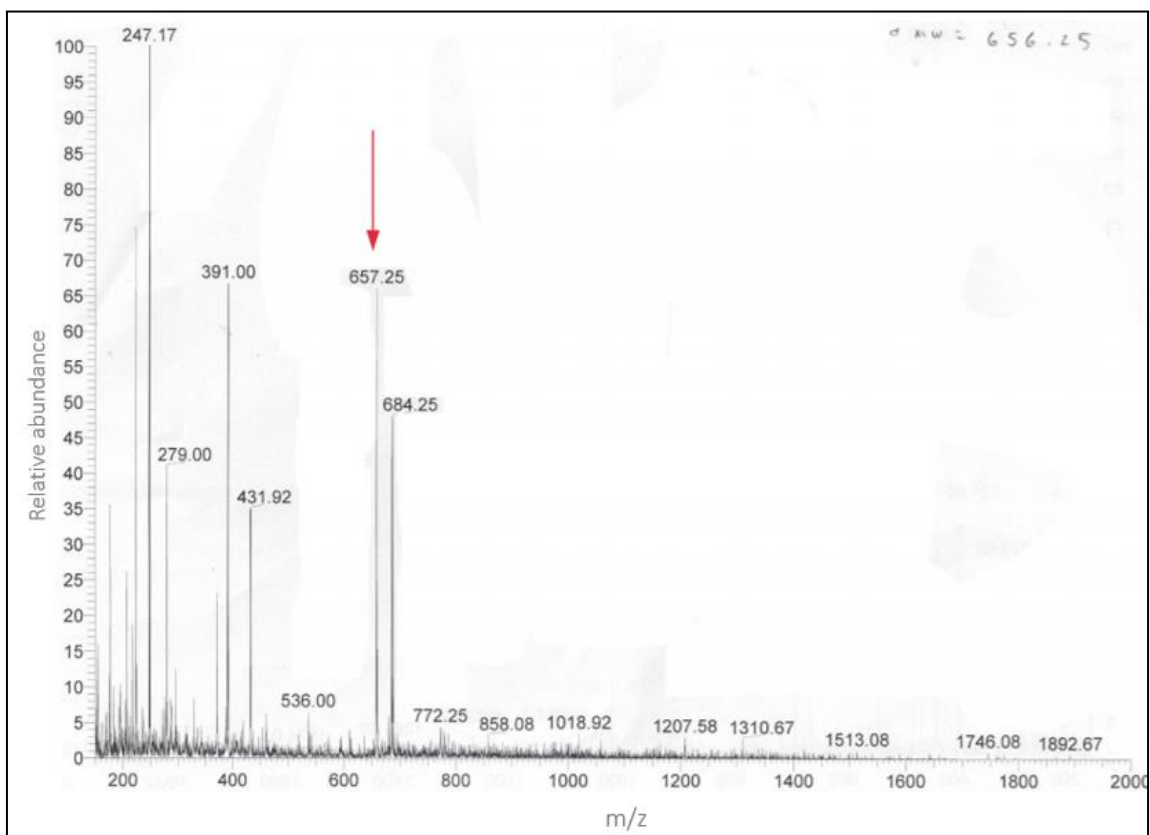


Figura 13. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente al pico con tiempo de retención 40.113 min. La flecha roja indica la masa correspondiente a algún Cy5. La masa teórica de Cy5 es de 641.24 g/mol.

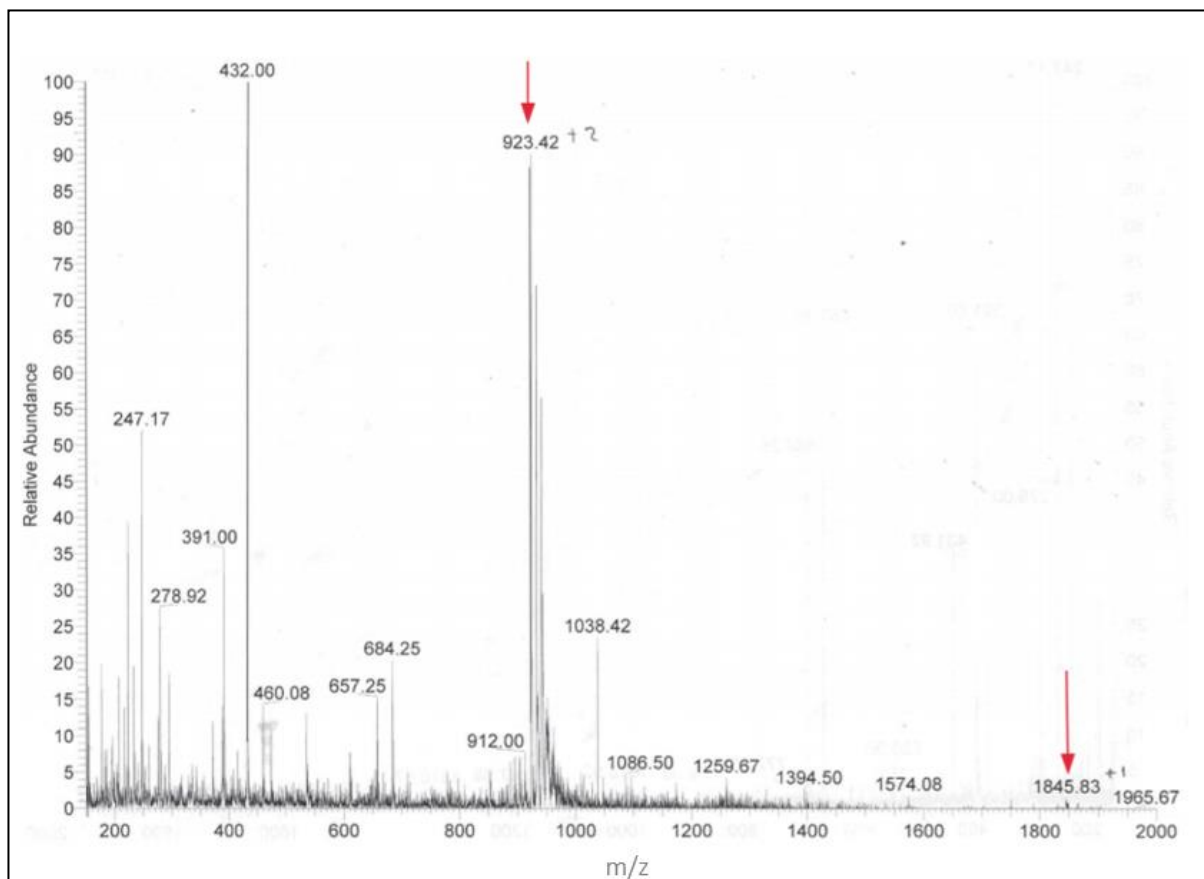


Figura 14. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente al pico con tiempo de retención 41.550 min. Dentro de la muestra encontramos dos pesos principales que corresponden a Cy5-G-speract con carga +1 y a Cy5-G-speract con carga +2 (señalados con una flecha roja). La masa teórica de Cy5-Gsperact 1,848.45g/mol.

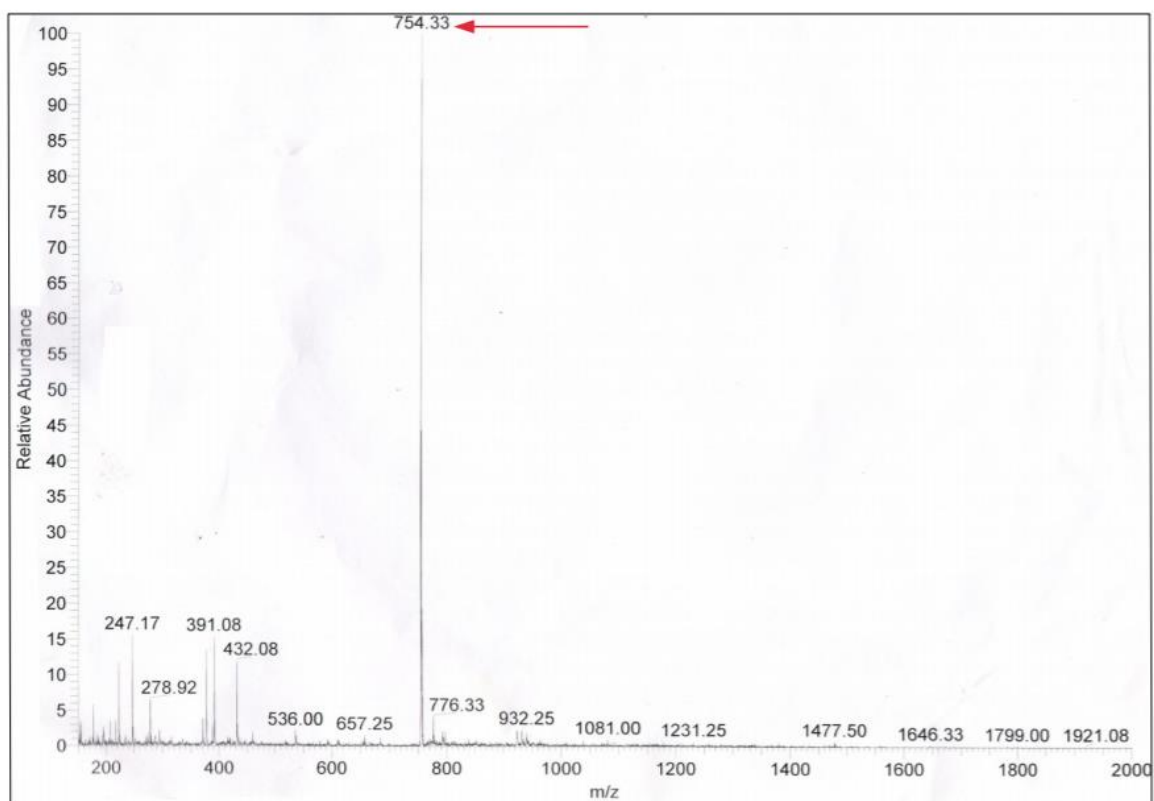


Figura 15. Espectro de masas obtenido mediante ionización por electrospray (ESI). Espectro correspondiente a Cy5-NHS-ester (indicado con la flecha roja) y que corresponde al tiempo de retención 43.923 min. La masa teórica de Cy5-NHS-ester es 753.88 g/mol.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE CY5-G-SPERACT

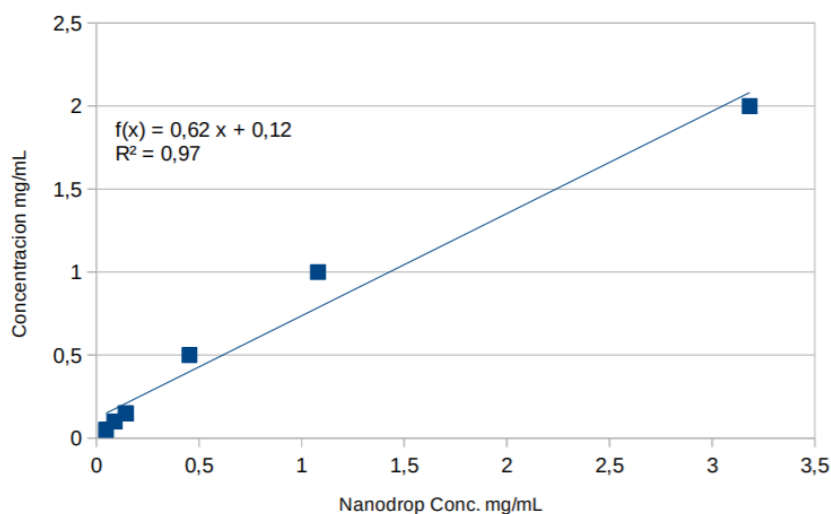


Gráfico 3. Precisión de Nanodrop 2000 vs una concentración de referencia (n = 5) Los valores de concentración son expresados en microgramos por mL.

Para corroborar la reproducibilidad y precisión del equipo al determinar la concentración del péptido marcado, medimos varias concentraciones conocidas de speract (desde 5-200 ug/mL), y realizamos una curva de reproducibilidad del sistema mostrado en la gráfica 3, las concentraciones del estándar conocido y las mediciones hechas por el Nanodrop 2000 son mostradas en la Tabla 1.

	Cy5-Gsperact ug/mL	Cy5-Gsperact ug/mL	G-speract ug/mL
G-speract	0.153	0.177	9.49
	0.131	0.153	8.237
	0.14	0.128	11.114
Promedio	0.14	0.15	9.61

Tabla 1. Concentraciones de speract determinadas en el Nanodrop 2000 en mg/mL. Se utilizó una longitud de onda UV que corresponde a la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm, sin embargo, solo reportamos la concentración.

	5 ug/mL	10 ug/mL	15 ug/mL	50 ug/mL	100 ug/mL	200 ug/mL
Speract	0.053	0.103	0.146	0.439	1.18	3.068
	0.045	0.089	0.135	0.479	1.117	3.297
	0.047	0.07	0.162	0.368	0.918	
	0.044		0.127	0.528	1.103	
Desv. STD	4.03E-03	1.66E-02	1.52E-02	6.76E-02	1.13E-01	1.62E-01

Tabla 2. Concentraciones de Cy5-G-speract y G-speract determinadas en el Nanodrop 2000 en mg/mL. Se utilizaron distintas concentraciones de speract y se midieron varias réplicas de cada una. Longitud de onda utilizada: 205 nm.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de Cy5-G-speract obtenidas, se obtuvieron aproximadamente 45 ug de péptido marcado en un volumen de 300 uL para una concentración final de 0.15 ug/ml de speract marcado.

5.7 CY5-G-SPERACT ES ESPECIFICO PARA SU RECEPTOR

Para confirmar la especificidad del péptido marcado hacia los receptores, pretratamos los espermatozoides con concentraciones saturantes de speract sin marcar, después se agregó Cy5-G-speract y se llevó a microscopio se excitó con la línea de laser de 640 nm y se recolecto la emisión de Cy5 a 666 nm .

La figura 16 demuestra que cuando se bloquean los receptores con pretratamiento con el péptido nativo, Cy5-G-speract no se une a ninguna estructura del flagelo y por lo tanto no muestra fluorescencia.

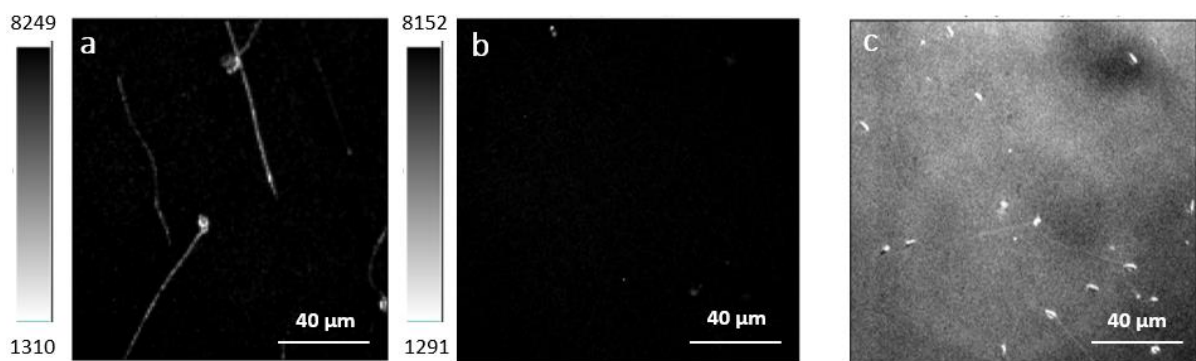


Figura 10. Especificidad de Cy5-G-speract por su receptor. a) Cy5-G-speract/sin competidor b) Cy5-G-speract/con competidor, se incubaron los receptores con 100nm de speract, después se agregó Cy5- G-speract y se excito con luz roja, c) Cy5-G-speract/con competidor campo claro.

5.8 CY5-G-SPERACT SUFRE UN FOTOBLANQUEO RÁPIDO.

Al llevar los espermatozoides marcados con Cy5-G-speract al microscopio TIRF (figura 17) observamos que el fluoróforo se fotoblanqueaba en menos de 100 imágenes (figura 17), lo cual no permitía recolectar suficiente información para realizar una buena reconstrucción de la estructura de interés.

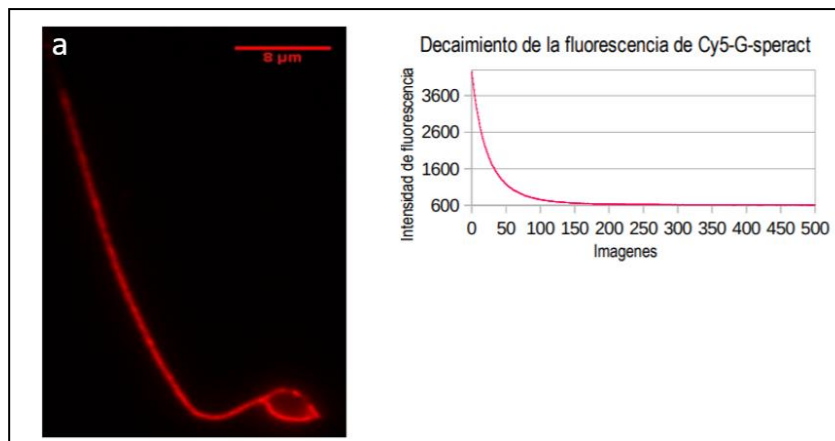
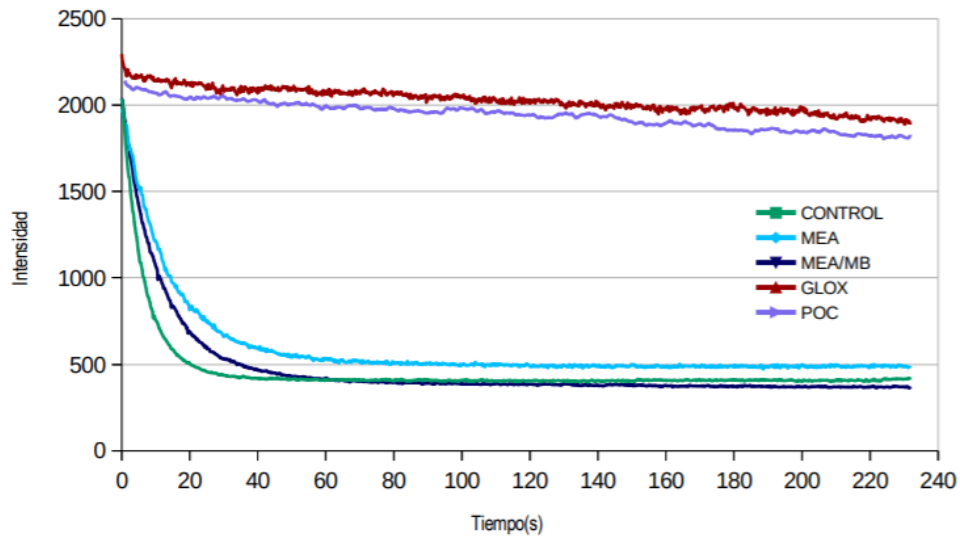


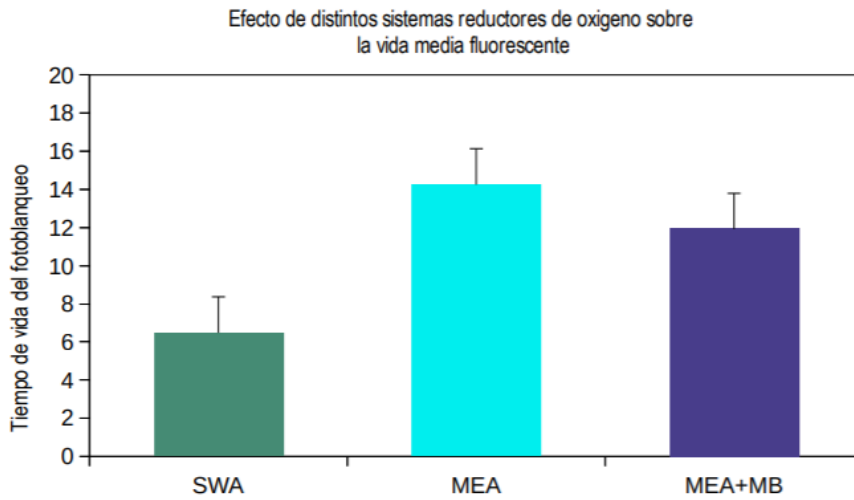
Figura 17. a) Espermatozoide de erizo de mar de *L. pictus* marcado con Cy5-G-speract. Microscopia TIRF, objetivo 100x, a la izquierda vemos la curva del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en espermatozoides de *L. pictus*. Las curvas fueron obtenidas delimitando la región de interés (flagelo) y graficando el resultado para una secuencia de imágenes en función del tiempo de adquisición.

5.9 AUMENTO DE LA FOTOESTABILIDAD DE CY5-G-SPERACT USANDO SISTEMAS REDUCTORES DE OXÍGENO.

Se ha demostrado que reducir el oxígeno en el medio de montaje puede aumentar la vida media del fotoblanqueo en algunos fluoróforos, con la finalidad de aumentar la fotoestabilidad de Cy5-G-speract se probaron distintos sistemas reductores de oxígeno.



Gráfica 4. Curvas del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en distintos medios en espermatozoides de *L. pictus*. Las curvas fueron obtenidas delimitando la región de interés (flagelo) y graficando el resultado para una secuencia de imágenes en función del tiempo de adquisición.



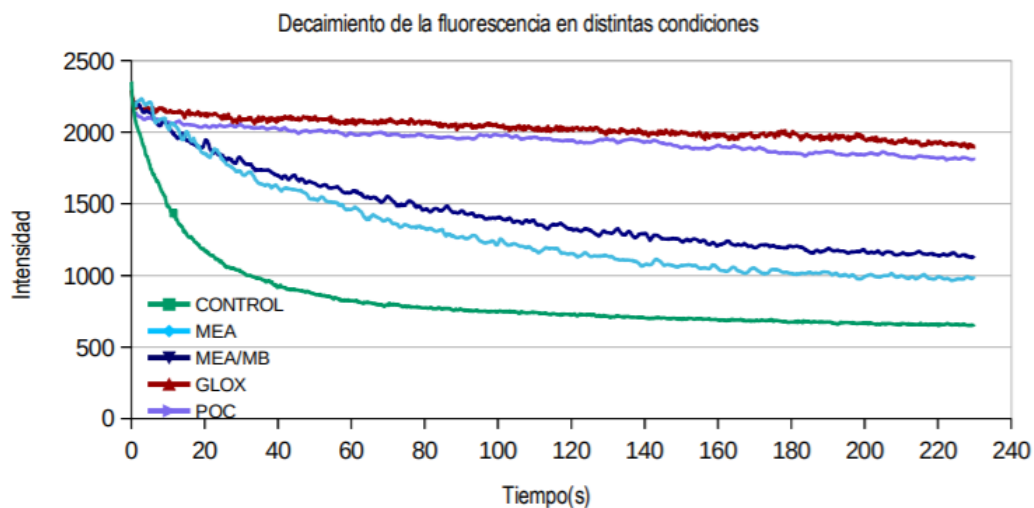
Gráfica 5. Comparación de las tasas del fotoblanqueo en distintas condiciones en espermatozoides *L. pictus*. La vida media fluorescente de los sistemas enzimáticos GLOX y POC no se incluye debido a que no siguen decaimientos exponenciales. Las barras de error representan el error estándar.

	AMA	AMA+MEA	AMA+MEA/MB	GLOX	POC
τ (s)	6.5 ± 0.6	14.2 ± 1.3	11.9 ± 0.58	>300	>300
N	15	20	52	14	15

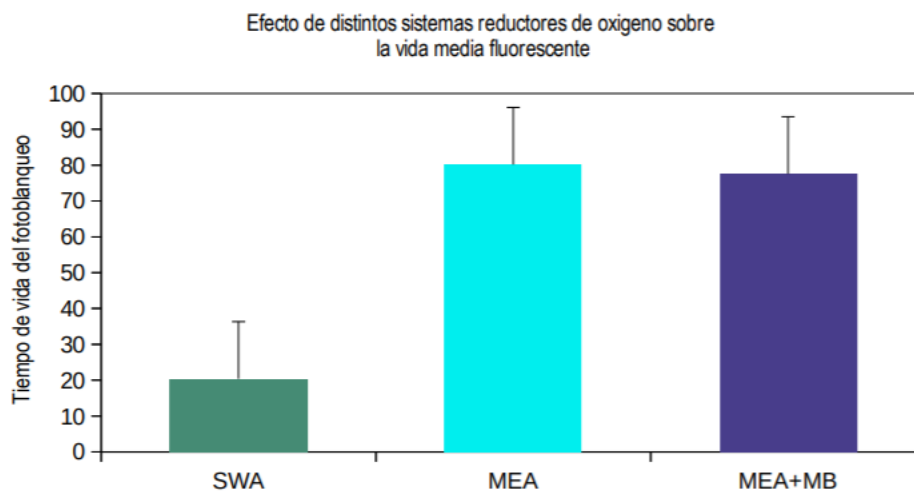
Tabla 3. Vida media del fotoblanqueo de los péptidos marcados con Cy5 en diferentes condiciones experimentales en espermatozoides del erizo de mar *L.pictus*. AMA(Agua de mar artificial).

En ambas especies el efecto del fotoblanqueo se reduce al máximo cuando se utiliza GOC y POC en los cuales la fluorescencia se mantiene esencialmente estable durante todo el tiempo de muestreo, el sistema MEA/MB o MEA también aumentan la fotoestabilidad del péptido, pero es menos efectivo que los sistemas enzimáticos (gráfica 5).

Estos mismos experimentos fueron repetidos nuevamente en otra especie de erizo de mar *S. purpuratus*, para corroborar el efecto de los sistemas reductores de oxígeno sobre la tasa de fotoblanqueo.



Gráfica 6. Curvas del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en distintos medios en espermatozoides de *S. purpuratus*. Las curvas fueron obtenidas delimitando la región de interés (flagelo) y graficando el resultado para una secuencia de imágenes en función del tiempo de adquisición.



Gráfica 7. Comparación de las tasas del fotoblanqueo en distintas condiciones en espermatozoides de *S. purpuratus*. La vida media fluorescente de los sistemas enzimáticos GLOX y POC no se incluye debido a que no siguen decaimientos exponenciales. Las barras de error representan el error estándar.

	AMA	AMA+MEA	AMA+MEAMB	GLOX	POC
τ (s)	20.4 ± 5.7	80.1 ± 21.1	77.6 ± 16.6	>300	>300
N	71	40	52	10	10

Tabla 4. Vida media del fotoblanqueo de los péptidos marcados con Cy5 en diferentes condiciones experimentales en espermatozoides del erizo de mar *S. purpuratus*.

Los resultados reflejan nuevamente que los sistemas enzimáticos son los mejores, sin embargo, en cuanto a los sistemas químicos (gráfica 6), el efecto sobre las tasas de fotoblanqueo es mucho mayor en espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (gráfica 7).

CAPÍTULO 6 • DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El péptido análogo presentó un tiempo de retención de 31.5 minutos (Figura 10), por medio de espectrometría de masas corroboramos que la fracción correspondía a G-speract por la coincidencia en el peso molecular teórico 1207.21 g/mol (Figura 12). En la Figura 11 se muestran los resultados de la reacción de marcaje de G-speract con Cy5 al ser separada por HPLC, los picos eluidos durante los primeros 15 minutos deben corresponder al buffer, donde se preparó la reacción ya que al ser más polares aparecen antes.

Por otro lado, existe una ausencia de pico con tiempo de retención 31.5 min lo cual es un fuerte indicador de que la mayoría del G-speract se consumió durante la reacción con Cy5-NHS éster. Solamente se analizaron por espectrometría de masas las fracciones con tiempos de retención más altos ya que se esperaba encontrar ahí al péptido marcado, debido a que la adición de Cy5 al péptido lo hace más hidrofóbico.

Los resultados muestran que la fracción de 40.1 min presenta dos especies principales una con peso molecular 683.25 g/mol y otra con peso molecular de 656.25 g/mol, las cuales podrían corresponder a productos de alguna reacción intermedia, ya que no coinciden con el peso molecular teórico de Cy5 (641.24 g/mol).

La fracción de 43.9 min coincide con el peso molecular teórico de Cy5-NHS éster (C37 H43 N3 O10 S2) de 753.88 g/mol (Figura 15), la segunda fracción con tiempo de retención de 41.3 min es la que coincide con el que el peso molecular teórico del péptido marcado con Cy5 (1844.8 g/mol, Figura 16). Esta fracción fue sometida a evaporización para obtener polvo del péptido marcado, que después se resuspendió en 300 μ L de agua miliQ, para obtener una concentración final de 0.15 μ g/mL.

Al probar los Cy5-G-speract en los espermatozoides observamos que existía marcaje en la cabeza, esto podría deberse al daño o ruptura de la membrana en la cabeza del espermatozoide o unión inespecífica. Esta última hipótesis se descartó mediante el bloqueo de los receptores con speract Figura16, donde después de agregar Cy5-G-speract e irradiar los espermatozoides con pulsos de luz roja no se observó fluorescencia.

Los experimentos de súper resolución exigen un alta fotoestabilidad del fluoróforo, sin embargo, al probar el péptido marcado se observó una alta tasa de fotoblanqueo. Una forma de disminuir las tasas de fotoblanqueo es reduciendo el oxígeno del medio de montaje, utilizando compuestos químicos o enzimas. Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo de emisión del fluoróforo antes del fotoblanqueo mejora al reducir el oxígeno en el medio de montaje, el efecto más drástico se observa en el uso de sistemas enzimáticos como POC y GOC.

El hecho de que la reducción de oxígeno del medio aumente la vida media del fotoblanqueo implica que el fotoblanqueo de Cy5-G-speract en su mayoría es debido a fotooxidación por especies reactivas de oxígeno, las cuales se forman por la interacción del oxígeno molecular presente en el agua de mar artificial con los estados triplete de Cy5.

A pesar de que Cy5 es conocido por ser poco propenso a entrar en estados triplete también se sabe que la viscosidad, solubilidad de oxígeno y la polaridad del disolvente pueden modificar las tasas de transición a su estado triplete (Widengren & Schwille, 2000), en nuestros experimentos podemos intuir que la vida media del fotoblanqueo de Cy-5-Gsperact se ve afectada por la entrada al estados triplete lo cual debe estar relacionado con el disolvente donde se encuentra Cy5, el cual es agua de mar artificial que es una mezcla de sales y minerales.

El sistema MEA Y MEA/MB tiene un efecto mucho menor sobre las tasas de fotoblanqueo respecto al efecto producido por los sistemas enzimáticos, que puede explicarse por dos razones:

1. La eficiencia de las enzimas para eliminar el oxígeno del medio es mejor que el del sistema redox formado por MEA/MB.
2. MEA(β -mercaptoetilamina) interacciona con la cadena de polimetina, y forma un compuesto no fluorescente de Cy5.

En el diseño experimental actual, donde se utiliza MEA o MEA/MB, no podemos diferenciar si ese limitado efecto sobre la vida media del fotoblanqueo es debido a fotooxidación o entrada a un estado no emisor, producto de la unión covalente de β -mercaptoetilamina-Cy5, esta conjetura puede descartarse si realizáramos experimentos con iluminación simultánea a una

longitud de onda de 640 nm y otro a 405 nm, ésto para romper la unión β -mercaptoetilamina-Cy5 que induce a los estados no fluorescentes.

Por otro lado el sistema reductor MEA/MB parece comportarse diferente en las dos especies, con un efecto mayor en *S.purpuratus*, una explicación a esta diferencia puede deberse a que cuando se realizaron los experimentos en *L.pictus* el microscopio utilizado recibió mantenimiento que pudo mejorar la eficiencia de transmisión de luz del láser, alternativamente existe la posibilidad de que estas diferencias en la vida media del fotoblanqueo estén relacionadas con el número de receptores de cada especie.

Se sabe que *L. pictus* posee al menos 3 veces más receptores para speract que *S. purpuratus*, por lo que hay más Cy5-G-speract unido al flagelo al excitarlos pueden producir mayor concentración localizada de ROS. Se tendrían que realizar nuevamente experimentos en *S. purpuratus*, sin embargo, solo la mitad del año tenemos acceso a la especie.

Desafortunadamente no se pudieron realizar experimentos de súper resolución debido a que, a pesar de que el erizo de mar es una especie relativamente fácil de manejar, son sensibles a cambios en la salinidad, pH y temperatura, las condiciones dentro de los acuarios, así como el transporte desde los arrecifes no fueron las óptimas, y varios lotes de erizos de mar se perdieron durante el semestre impidiendo terminar la última fase de los experimentos.

CAPÍTULO 7 • CONCLUSIONES

- G-speract demostró inducir actividad biológica en los espermatozoides de erizo de mar incluso a concentraciones picomolares, a diferencia del péptido nativo que induce respuesta biológica en concentraciones nanomolares.
- En AMA Cy5-Gsperact muestra altas tazas de fotoblanqueo, que pueden reducirse cuando se disminuye la concentración de oxígeno en el medio de montaje. Siendo los sistemas enzimáticos los mejores ya que mantienen la fluorescencia esencialmente estable durante todo el tiempo de muestreo.

CAPÍTULO 8 • PERSPECTIVAS

El objetivo principal del proyecto era realizar microscopia de súper resolución, aunque no fue posible durante este lapso, no se descarta posibilidad de continuar con el proyecto además de que las condiciones experimentales parecen estar estandarizadas para el sistema de estudio. Es necesario realizar experimentos que nos permitan saber si la diferencia en el efectos de MEA/MB sobre la tasa de fotoblanqueo en ambas especies es debido a características relacionadas con el número de receptores del espermatozoide.

Así como estudiar los estados triplete de Cy5-G-speract en agua de mar para corroborar los resultados obtenidos e identificar la razón por la cual el sistema redox formado por MEA/MB, tiene un efecto menor sobre las tasas de fotoblanqueo. Finalmente podría ser de interés demostrar si la ausencia del apagamiento de la fluorescencia en el péptido análogo es debido al uso de un espaciador o si se debe a la elección del fluoróforo y cuál puede ser el número mínimo de aminoácidos que funcionen como espaciador para evitar el apagamiento de la fluorescencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Arcos-Hernandez, C., Romero, F., Sanchez-Guevara, Y., Beltran, C., & Nishigaki, T. (2016). FRET analysis using sperm-activating peptides tagged with fluorescent proteins reveals that ligand-binding sites exist as clusters. *Journal Of Experimental Biology*, 219(4), 508-515. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.127662>
- Cardullo, R., & Herrick, S. (1994). Speract Receptors Are Localized on Sea Urchin Sperm Flagella Using a Fluorescent Peptide Analog. *Developmental Biology*, 162(2), 600-607. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1994.1113>
- DANGOTT, L., & GARBERS, D. (1987). Further Characterization of a Speract Receptor on Sea Urchin Spermatozoa. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 513(1 Cell Biology), 274-285. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb25015.x>
- Dangott, L., Jordan, J., Bellet, R., & Garbers, D. (1989). Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 86(7), 2128-2132. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.7.2128>
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B., Nishigaki, T., & Wood, C. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *The International Journal Of Developmental Biology*, 52(5-6), 595-606. <http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.072550a>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International review of cytology*, 243, 79-172. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43002-8)
- Dempsey, G., Bates, M., Kowtoniuk, W., Liu, D., Tsien, R., & Zhuang, X. (2010). Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *Biophysical Journal*, 98(3), 394a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.2126>
- Eisenbach, M. (1999). Sperm chemotaxis. *Reviews Of Reproduction*, 4(1), 56-66. <http://dx.doi.org/10.1530/revreprod/4.1.56>
- Fluorescent Indocyanines for Color-Coded Surgery. (2018). Retrieved from <https://heterocyclist.com/2011/12/15/fluorescent-indocyanines-for-colorcoded-surgery/>
- Gilbert, S. (2005). *Biología del desarrollo* (p. 197). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Gray, J. (1928) *Br. J. Exp. Biol.* 5, 362-365
- Hansbrough, J., & Garbers, D. (1981). Purification and characteristics of a peptide (speract) associated with eggs that stimulates spermatozoa. *Advances In Enzyme Regulation*, 19, 351-376. [http://dx.doi.org/10.1016/0065-2571\(81\)90024-8](http://dx.doi.org/10.1016/0065-2571(81)90024-8)
- Jameson, D. (2014). *Introduction to fluorescence*. Boca Raton [u.a.]: CRC Press Taylor & Francis.
- Lopo, A., & Glabe, C. (1982). SPERM-EGG BINDING EVENTS DURING SEA URCHIN FERTILIZATION. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 383(1 The Cell Biol), 405-425. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb23181.x>
- Mondal, P. (2016). Spatio-temporal Super-resolution Optical Fluorescence Microscopy. *iScience Notes*, 1(1), pp.4-4. 4
- Nishigaki, T., Zamudio, F., Possani, L., & Darszon, A. (2001). Time-Resolved Sperm Responses to an Egg Peptide Measured by Stopped-Flow Fluorometry. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 284(2), 531-535. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5000>
- Nishigaki, T., & Darszon, A. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor.

- Developmental biology, 223(1), 17–26. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000>
- Ohlendieck, K., & Lennarz, W. (1996). 2 Molecular Mechanisms of Gamete Recognition in Sea Urchin Fertilization. *Current Topics In Developmental Biology* Volume 32, 39-58. [http://dx.doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60424-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60424-x)
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacquier, V. D., Lennarz, W. J. and Kitajima, K. (2000). Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm. *Glycoconj. J.* 17, 205-214.
- Rust, M., & Bates, M. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10), 793-796. doi: 10.1038/nmeth929
- Schäfer, P., & van de Linde, S. (2013). Methylene Blue- and Thiol-Based Oxygen Depletion for Super-Resolution Imaging. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3393-3400. doi: 10.1021/ac400035k
- Single-Molecule Super-Resolution Imaging. (2018). Nikon's MicroscopyU. Retrieved 6 February 2018, from <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/single-molecule-super-resolution-imaging>
- Suzuki, N. (1981). Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 99(4), 1238-1244. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(81\)90752-x](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(81)90752-x)
- Suzuki, N. (1995). Structure, Function and Biosynthesis of Sperm-Activating Peptides and Fucose Sulfate Glycoconjugate in the Extracellular Coat of sea Urchin Eggs. *Zoological Science*, 12(1), 13-27. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.12.13>
- Swoboda, M., & Henig, J. (2012). Photostability without pH Drop - An Alternative Oxygen Scavenging System for Single-Molecule FRET Experiments. *Biophysical Journal*, 102(3), 179a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.972>
- Tennett, E., Ciuba, M., & Levitus, M. (2014). Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.*, 43(4), 1057- 1075. doi: 10.1039/c3cs60211g
- Texier, I., Goutayer, M., Da Silva, A., Guyon, L., Djaker, N., Josserand, V. and Neumann, E., 2019. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging.
- Toseland, C. and Fili, N. (n.d.). *Fluorescent Methods for Molecular Motors*.
- Widengren, J., & Schwille, P. (2000). Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *The Journal Of Physical Chemistry A*, 104(27), 6416-6428. doi: 10.1021/jp000059s
- Wood, C. D., Darszon, A., & Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *The Journal of cell biology*, 161(1), 89–101. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212>
- Zhegalova, N., & He, S. (2014). Minimization of self-quenching fluorescence on dyes conjugated to biomolecules with multiple labeling sites via asymmetrically charged NIR fluorophores. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 9(5), 355-362. doi: 10.1002/cmml.1585.
- Zheng, Q., Jockusch, S., Zhou, Z., & Blanchard, S. (2013). The Contribution of Reactive Oxygen Species to the Photobleaching of Organic Fluorophores. *Photochemistry And Photobiology*, 90(2), 448-454. doi: 10.1111/php.12204

