



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dra. Ilona Concha G.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**EXPRESION DEL RECEPTOR DE DOPAMINA
TIPO D2 EN LINEA GERMINAL MASCULINA Y SU
EFECTO EN LA VIABILIDAD ESPERMATICA**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

MAURICIO ANDRES TORRES GUTIERREZ

VALDIVIA-CHILE

2006

Dedicada a mi familia, en especial a mi madre Blanca y mis hermanos Nancy, Claudio y Yohana.

Gracias a Dios por todos mis logros.

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Señalización Celular del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos: Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile DIDUACH N° 200460 y 200409, MECESUP y FONDECYT 1060135.

Parte del trabajo realizado en esta tesis dio origen a la siguiente publicación:

-Carola Otth, **Mauricio Torres**, Alfredo Ramírez, Juan Carlos Fernández, Maite Castro, M. Cecilia Rauch, Mónica Brito, Alejandro J. Yañez, Joan-Enric Rodríguez-Gil, Juan Carlos Slebe and Ilona I. Concha. (2006) Novel Identification of Peripheral Dopaminergic D2 Receptor in Male Germ Cells. *J Cell Biochem* (en prensa).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesora patrocinante Dra. Ilona Concha, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por el constante apoyo entregado durante la realización de esta tesis, además, por sus oportunos, invaluable y sabios consejos que muchas veces fueron claves para ayudar con mis problemas intelectuales, de ánimo y personales.

Agradecer también al director del Instituto de Bioquímica Dr. Juan Carlos Slebe por sus consejos y orientación en mi formación profesional.

Al Dr. Juan Carlos Vera por su apoyo desinteresado y excelentes sugerencias brindadas en los comienzos de esta tesis.

Quisiera agradecer también a la profesora TM Mónica Brito por su paciencia y apoyo en diversas técnicas de laboratorio que fueron vitales para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial para Carola Otth por el gran apoyo entregado en mi formación en el inicio de mi trabajo en el laboratorio y también a mis compañeros de laboratorio por la paciencia y la disposición para responder innumerables consultas, en especial a Alfredo Ramírez, Maite Castro, Constanza Angulo y en algún momento también Angara Zambrano y Cecilia Rauch, a todos ustedes “muchas gracias por todo”.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer también a Lidia por su paciencia y el invaluable apoyo brindado durante una etapa muy importante de mi vida, todos mis logros son también tuyos.

INDICE DE CONTENIDOS		Página
INDICE		i
INDICE DE FIGURAS		v
LISTA DE ABREVIATURAS		vii
1. RESUMEN		1
SUMMARY		2
2. INTRODUCCIÓN		3
3. MATERIALES Y MÉTODOS		25
3.1 Materiales		25
3.1.1 Material biológico		25
3.1.2 Reactivos químicos		25
3.2 Métodos		29
3.2.1 Uso de animales de experimentación		29
3.2.2 Cultivo primario de neuronas		29
3.2.3 Extracción de RNA total		30
3.2.4 Electroforesis en geles de agarosa/formaldehído		31
3.2.5 Síntesis del cDNA		31
3.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)		32
3.2.7 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de rata		32
3.2.8 Separación de células germinales de testículo de rata		34
3.2.9 Inmunocitoquímica en esparcidos de espermatoцитos y espermátidas de testículo de rata		35
3.2.10 Obtención de espermatozoides de rata, bovino y humano		36

3.2.11 Inmunocitoquímica fluorescente de espermatozoides de rata, bovino y humano	37
3.2.12 Inmunocitoquímica de Akt fosforilada en espermatozoides frescos de bovino	38
3.2.13 Extracción de proteínas	39
3.2.14 Separación electroforética de proteínas	39
3.2.15 Electrotransferencia	40
3.2.16 Detección inmunológica	41
3.2.17 inmunoprecipitación	42
3.2.18 Determinación de viabilidad en espermatozoides	43
3.2.19 Estudio funcional del receptor dopamina D2 en espermatozoides	45
3.2.19.1 Efecto de dopamina en la fosforilación de proteínas	45
3.2.19.2 Efecto de dopamina en la viabilidad celular	46
3.2.19.3 Efecto de dopamina en el transporte de 3-O-metilglucosa	46
3.2.20 Análisis estadísticos	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Expresión del receptor de dopamina tipo D2 en testículo de rata	49
4.1.1 Gen del receptor de dopamina tipo D2 y diseño de partidores	49
4.1.2 Obtención de RNA total de testículo de rata	50
4.1.3 Amplificación por RT-PCR del receptor D2 en testículo de rata	51
4.2 Inmunolocalización del receptor de dopamina D2 en línea germinal masculina	53
4.2.1 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de rata adulta y pre-púber	53

4.2.2 Inmunocitoquímica en espermatoцитos y espermátidas de testículo de rata	56
4.2.3 Inmunofluorescencia del receptor D2 sobre espermatozoides de rata, toro y humano	58
4.3 Inmunodetección del receptor D2 en extractos proteicos de rata	61
4.3.1 Inmunoprecipitación del receptor D2 de extractos proteicos de rata, humano y bovino	63
4.4 Inmunodetección de PI3K sobre espermatozoides humanos y bovinos	64
4.5 Inmunodetección de las proteínas pro-apoptóticas BAD y caspasa-9 sobre espermatozoides humanos y bovinos	66
4.6 Inmunodetección de la proteína Akt fosforilada sobre espermatozoides frescos de bovino	69
4.7 Efecto de dopamina sobre la distribución subcelular de p-Akt (Ser-473) en espermatozoides de bovino	71
4.8 Análisis de Western blot de la activación de p-Akt Ser-473 en extractos proteicos de espermatozoides de bovino	74
4.9 Efecto de dopamina sobre la fosforilación en tirosinas en espermatozoides frescos de bovino	77
4.10 Efecto de dopamina sobre la viabilidad celular de espermatozoides frescos de bovino	81
4.11 Análisis de Western blot de p-Akt Ser-473 en espermatozoides de bovino tratados con dopamina y enfrentados al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno	83

4.12 Efecto de dopamina sobre el transporte de 3-O-metilglucosa en espermatozoides frescos de bovino	85
5. DISCUSIÓN	87
6. BIBLIOGRAFÍA	127

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Metabolismo y receptores de dopamina	7
Figura 2: El túbulo seminífero y la producción de espermatozoides	18
Figura 3: Determinación de la viabilidad espermática	44
Figura 4: Esquema del gen del receptor de dopamina D2 y diseño de partidores	49
Figura 5: Electroforesis de RNA de diferentes tejidos de rata	50
Figura 6: Amplificación por RT-PCR de transcritos del receptor de dopamina D2	52
Figura 7: Inmunodetección del receptor D2 en túbulos seminíferos de rata pre-púber	54
Figura 8: Inmunodetección del receptor D2 en túbulos seminíferos de rata adulta	55
Figura 9: Inmunodetección del receptor D2 en células germinales aisladas de rata	57
Figura 10: Inmunodetección fluorescente del receptor D2 en espermatozoides de rata	59
Figura 11: Inmunodetección fluorescente del receptor D2 en espermatozoides de toro y humano	60
Figura 12: Inmunodetección del receptor D2 en extractos proteicos de diferentes especies	62
Figura 13: Inmunodetección fluorescente de la proteína PI3K sobre espermatozoides humanos y bovinos	65
Figura 14: Inmunodetección fluorescente de la proteína BAD sobre espermatozoides humanos y bovinos	67
Figura 15: Inmunodetección fluorescente de la proteína Caspasa-9 sobre espermatozoides humanos y bovinos	68

Figura 16: Inmunodetección de la proteína Akt fosforilada sobre espermatozoides frescos de bovino	70
Figura 17: Efecto de dopamina en la localización subcelular de la proteína p-Akt-S-473 en espermatozoides de bovino	73
Figura 18: Análisis de Western blot de la activación de p-Akt Ser-473 en extractos proteicos de espermatozoides de bovino	76
Figura 19: Efecto de dopamina sobre la fosforilación en tirosinas en espermatozoides de bovino	79
Figura 20: Análisis de Western blot de fosfo-tirosinas en espermatozoides frescos de toro después de 1 hora de estimulación con dopamina	80
Figura 21: Efecto de dopamina en la viabilidad de espermatozoides frescos de toro	82
Figura 22: Análisis de Western blot de p-Akt Ser-473 de espermatozoides frescos de bovino después de 1 hora de incubación con H ₂ O ₂ 10 mM	84
Figura 23: Efecto de dopamina en el transporte de 3-OMG (0,5 mM) en espermatozoides de bovino	86

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	: aminoácido
AC	: adenilato ciclasa
A.E.	: actividad específica
AEA	: anandamida
BH ₄	: tetrahidrobiopterina
BSA	: albúmina sérica de bovino
CaMK	: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina
cDNA	: DNA complementario
CREB	: proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP.
COMT	: catecol-O-metiltransferasa
DAB	: 3,3'-diaminobenzidina
DAT	: transportador de dopamina
DARPP-32	: fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y cAMP
DDC	: L-DOPA descarboxilasa
DMSO	: dimetilsulfóxido
dNTP	: desoxinucleótidos 5'-trifosfato
DOPAC	: ácido dihidroxifenilacético
DTT	: ditioneitol
D2L	: isoforma larga del receptor de dopamina D2
D2R	: receptor de dopamina D2
D2S	: isoforma corta del receptor de dopamina D2
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
FAAH	: amida hidrolasa de ácidos grasos
FSH	: hormona folículo estimulante
GLUT	: transportador facilitativo de hexosa
Gn-RH	: hormona liberadora de gonadotropinas
GM-CSF	: factor de estimulación de colonia granulocito-macrófago
GPCR	: receptores acoplados a proteína G

GRK	: quinasa de receptores acoplados a proteína G
HEPES	: [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico)]
HVA	: ácido homovanílico
IP3	: inositol trifosfato
K _m	: constante de Michaelis-Menten
L-DOPA	: 3,4-dihidroxifenilalanina
LH	: hormona luteinizante
MAPK	: proteína quinasa activadora de mitógeno
MAO	: monoamino-oxidasa
NAPEs	: <i>N</i> -acil-fosfatidiletanolaminas
NAPE-PLD	: fosfolipasa D de NAPEs
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDK	: proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol
PI3K	: fosfatidilinositol 3-OH quinasa
PKA	: proteína quinasa A
PKB	: proteína quinasa B
PKC	: proteína quinasa C
PLC	: fosfolipasa C
PM	: peso molecular
PMSF	: fenilmetilsulfonil fluoruro
PTX	: toxina de Bordetella pertussis
PVDF	: membrana de polivinilidina difluoruro
mRNA	: RNA mensajero
RT-PCR	: reacción de la polimerasa en cadena desde RNA total
SHOCK	: insuficiencia circulatoria aguda
SNC	: sistema nervioso central
SDS	: dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

TAE	: tampón acetato EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TH	: tirosina hidroxilasa
Tris	: tris-(hidroximetil)-aminometano
Triton X-100	: octil fenoxi polietoxietanol
UV	: ultravioleta
VMAT	: transportador de monoaminas vesicular
VSCC	: canales de calcio sensibles a voltaje
3-OMG	: 3-O-metilglucosa

1. RESUMEN

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, emotividad y la afectividad, así como en la comunicación neuroendocrina. La presencia de receptores de dopamina periféricos ha sido descrita a nivel cardiovascular, adrenal y renal, sin embargo, poco se sabe acerca de su función. En la presente tesis, se analizó la expresión del receptor D2 en testículo y células espermatozógenas de rata, así como en espermatozoides de otros mamíferos. El análisis de RT-PCR del mRNA del testículo de rata logró amplificar bandas específicas correspondientes a las isoformas del receptor D2 (L y S), previamente descritas en el cerebro. Usando análisis de Western Blot, se confirmó que la proteína está presente en el testículo de rata, células espermatozógenas aisladas y en espermatozoides de diferentes mamíferos tales como rata, toro y humano. El análisis de inmunohistoquímica del testículo adulto de rata mostró que el receptor D2 es expresado en todas las células germinales (en fase pre y post-meiótica) del túbulo con tinción predominante en espermatoogonia. Por medio de diferentes estrategias experimentales se analizó el efecto de dopamina sobre la viabilidad espermática, fosforilación de proteínas y transporte de glucosa, sugiriendo un importante rol funcional en la fisiología de estas células.

SUMMARY

Dopamine is the major catecholaminergic transmitter in the Central Nervous System, where it is involved in a wide variety of functions such as motor activity, emotivity, affectiviness and neuroendocrine communication. The presence of peripheral dopamine receptors has been demonstrated cardiovascular, adrenal and renal tissues, however, little is known about their function. In the present thesis the expression of D2 receptors was analyzed in rat testis and spermatogenic cells, as well as spermatozoa in others mammals. The RT-PCR analysis of rat testis mRNA showed specific bands corresponding to the dopamine receptor D2R (L and S) isoforms previously described in the brain. Using Western blot analysis, we confirmed that the proteins are present in rat testis, isolated spermatogenic cells and also in spermatozoa of a range of different mammals, such as rat, bull and human. The immunohistochemistry analysis of rat adult testis showed that the D2 receptor is expressed in all germ cells (pre and post-meiotic phase) of the tubule with staining predominant in spermatogonia. Through different experimental strategies the effect of dopamine on the spermatic viability, protein phosphorylation and glucose transport was analyzed, suggesting an important role in the physiology of these cells.

2. INTRODUCCION

La dopamina, noradrenalina y adrenalina pertenecen a una clase de neurotransmisores conocidos como catecolaminas. De las catecolaminas, la dopamina es la más abundante e importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos donde modula variadas funciones como el control motor, memoria, afectividad, placer, adicción y secreción neuroendocrina (Bahena y col., 2000). El estudio de la dopamina y sus receptores se ha centrado principalmente en el SNC, debido a que distintas alteraciones de los sistemas dopaminérgicos han sido asociados con patologías neuronales severas como la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y psicosis, así como la adicción a drogas como cocaína, anfetaminas, marihuana y alcohol (Balk y col., 1995), (Robbins y col., 1999), (Gordon y col., 2001). La dopamina y sus receptores, también han sido descritos a nivel periférico, donde modulan la función renal, adrenal, gastrointestinal y cardiovascular (Hussain y col., 2003), (Kujacic y col., 1995), (Lí y col., 2004), (Missale y col., 1988).

Dopamina: síntesis, liberación y término de la acción.

En las células dopaminérgicas la dopamina se sintetiza en el citoplasma a partir del aminoácido L-tirosina por la acción secuencial de 2 enzimas; la **Tirosina Hidroxilasa** (TH), que cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina utilizando oxígeno molecular como sustrato y tetrahidrobiopterina (BH₄) e Hierro como cofactores para generar L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina). La TH es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas y su actividad es altamente regulada por la concentración local de BH₄, productos y su estado de fosforilación (Fujisawa y col., 1987), (Zigmond y col., 1989). La segunda enzima, la **L-DOPA descarboxilasa** (DDC)

cataliza la eliminación del grupo carboxilo de la L-DOPA para generar dopamina. La alta actividad de esta enzima bajo condiciones normales produce que los niveles de L-DOPA intracelular sean prácticamente indetectables (**Fig. 1A**), (Neff y col., 1995). La dopamina sintetizada puede ser liberada directamente al espacio extracelular o bien almacenada en vesículas por un **Transportador de Monoaminas Vesicular** (VMAT), en donde puede alcanzar concentraciones extremadamente altas (0,5-0,6 M), esta acumulación facilita su liberación regulada a través de mecanismos de exocitosis dependiente de calcio (Bonisch y col., 1998). Una vez que la dopamina es liberada y ha actuado sobre sus receptores, su acción es terminada a través de 2 mecanismos; la recaptación y el catabolismo. La recaptación es el principal mecanismo y es realizada por un transportador de membrana de alta afinidad conocido como el **Transportador de dopamina** (DAT). El DAT recicla la dopamina a través de un cotransporte con 2 iones Na^+ y 1 de Cl^- . Alrededor del 70 al 80% de la dopamina liberada al espacio extracelular es inactivada por este proceso. La actividad del DAT puede ser modulada por segundos mensajeros como el diacilglicerol y el ácido araquidónico. Además, la actividad del DAT es inhibida por drogas como cocaína y anfetaminas generando un prolongado incremento de la dopamina extracelular y dando como resultado final un aumento de la señalización celular dopaminérgica (Blakely y col., 2000). El segundo mecanismo de término de acción de la dopamina es a través de su catabolismo por la acción de 2 enzimas llamadas **Monoamino-oxidasa** (MAO) y la **Catecol-O-metiltransferasa** (COMT) para generar los metabolitos inactivos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), los que son posteriormente eliminados del organismo a través de la orina (**Fig. 1B**), (Boulton y col., 1998).

Principales características de los receptores dopaminérgicos

Los receptores de dopamina pertenecen a la familia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G (GPCR). Hasta el momento se han aislado, caracterizado y clonado cinco tipos de receptores de dopamina. De acuerdo a sus características farmacológicas los receptores se clasifican en dos grupos llamados D1 y D2 (**Fig. 1C**). Los receptores del grupo D1 están compuestos por los subtipos **D1** y **D5**, estos se caracterizan por estar unidos a la proteína G_{α_s} que estimula a la adenilato ciclasa (AC) para producir el segundo mensajero cAMP. Los receptores del grupo D2 están formados por los subtipos **D2**, **D3** y **D4**, los que se caracterizan por estar unidos a la proteína $G_{\alpha_{i/o}}$ que clásicamente inhiben la actividad de la AC evitando el aumento de cAMP (Missale y col., 1998). Esta clasificación farmacológica fue propuesta en el año 1979 y se ha mantenido hasta nuestros días (Kebabian y col., 1979). Además de las diferencias farmacológicas, los receptores tipo D1 y D2 presentan importantes diferencias estructurales. La organización genómica de estos receptores soporta la idea que derivan de 2 familias génicas que se diferencian por la presencia o ausencia de intrones en sus secuencias codificantes. Los genes que codifican para los receptores D1 y D5 no contienen intrones en su estructura. Al contrario, los genes que codifican para los receptores D2, D3, D4 son interrumpidos por intrones, lo que permite la generación de variadas isoformas a través de procesamiento alternativo (Fryxell, 1995).

A nivel de estructura proteica los receptores de dopamina tienen el amino terminal hacia la región extracelular y presentan varios potenciales sitios de N-glicosilación. El carboxilo terminal se localiza hacia el citoplasma y es cerca de siete

veces más largo en los receptores tipo D1 que en los de tipo D2, es rico en residuos serina y treonina y contienen un residuo conservado de cisteína presente en todos los GPCR por el cual los receptores se anclan a la membrana plasmática vía palmitoilación (Lachowicz y col., 1997). Similar a otros GPCR, los receptores de dopamina tienen dos cisteínas localizadas en el primer y segundo lazo extracitoplasmático que forman un puente disulfuro que estabiliza la estructura terciaria del receptor (**Fig. 1C**), (Missale y col., 1998). En el caso del tercer lazo intracitoplasmático, este es significativamente más largo para los receptores tipo D2, esta característica es común para los receptores que se acoplan a proteínas del tipo $G_{\alpha_{i/o}}$, mientras que los receptores de tipo D1 tienen un tercer lazo intracitoplasmático corto, que es característico de receptores acoplados a proteínas G_{α_s} (**Fig. 1C**), (Missale y col., 1998). En los receptores de dopamina, el tercer lazo intracitoplasmático corresponde al lugar donde se presenta la mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos, el cual puede ser responsable de sus respectivos sistemas de segundos mensajeros. En ambas familias, se han detectado sitios de fosforilación dentro del tercer lazo intracitoplasmático y en el carboxilo terminal para quinasas reguladas por segundos mensajeros, como la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y proteínas quinasas de receptores unidos a proteína G (GRK). Estas señales pueden regular la desensibilización del receptor (desacoplamiento de la proteína G al receptor) o producir la internalización del receptor (por unión de moléculas tipo arrestina y endocitosis por vesículas de clatrina). Este último proceso puede ser revertido reciclando el receptor a la membrana o puede seguir la ruta de degradación por vía lisosomal (**Fig. 1C**), (Mason y col., 2002), (Namkung y col., 2004).

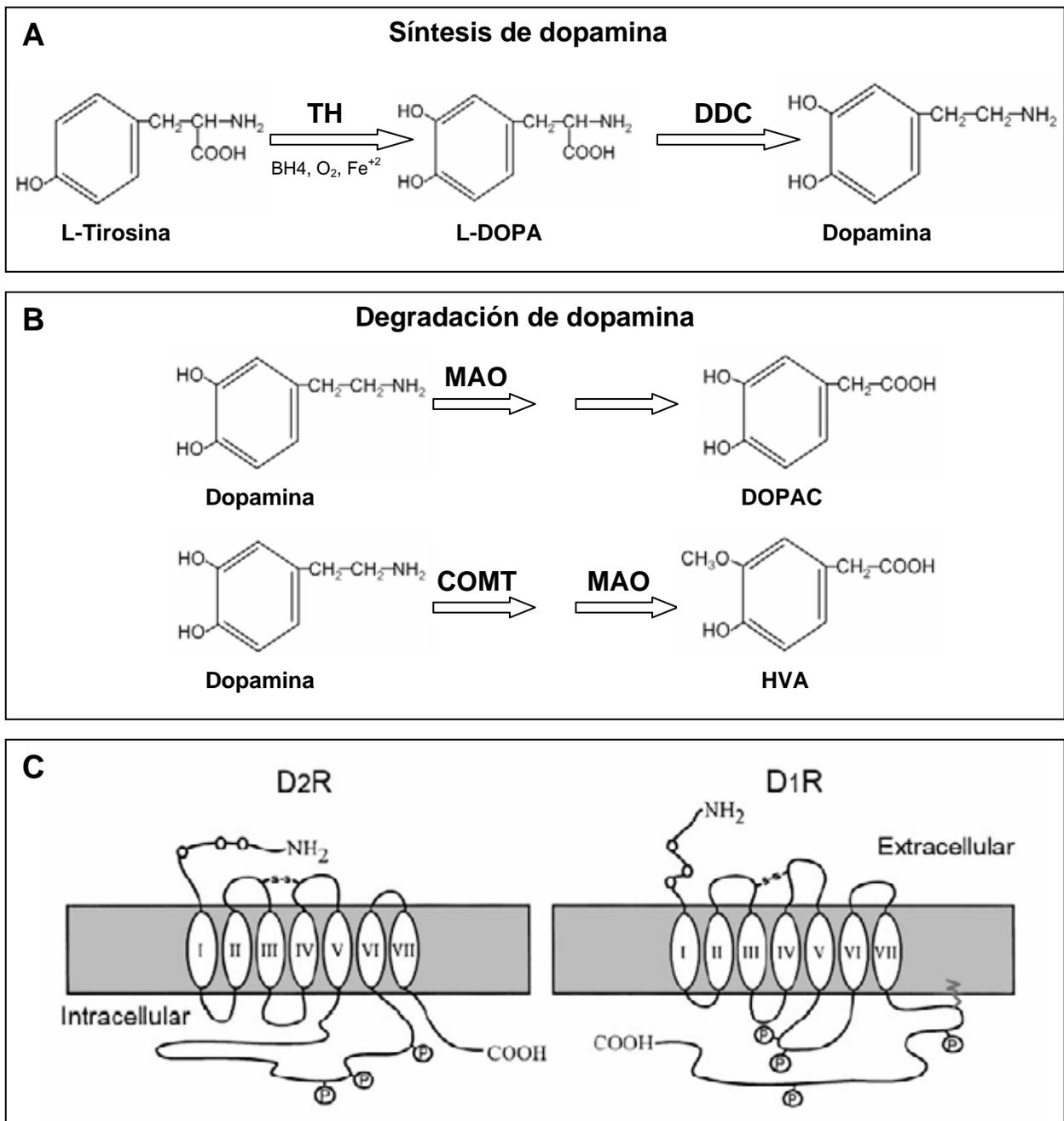


Figura 1: Metabolismo y receptores de dopamina: A) Tirosina Hidroxilasa (TH), L-DOPA descarboxilasa (DDC), 3,4-dihidroxi fenilalanina (L-DOPA), 3,4-dihidroxi feniletilamina (Dopamina). **B)** Monoamino-Oxidasa (MAO), Catecol-O-metiltransferasa (COMT), 3,4-dihidroxi fenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA). **C)** Receptores tipo D1 (D₁R), receptores tipo D2 (D₂R). (Ben-Jonathan y col., 2001).

El receptor de dopamina D2: estructura y señalización celular.

El receptor D2 fue el primer receptor de dopamina clonado a partir de una biblioteca de cDNA de cerebro de rata por Bunzow y col., (1988), el que aisló un cDNA de 1245 nucleótidos codificando una proteína de 415 aminoácidos. Estudios posteriores en rata identificaron un segundo cDNA del receptor D2 con una inserción de 87 nucleótidos codificando una proteína de 444 aminoácidos, sugiriendo la presencia de un procesamiento alternativo del mRNA del receptor D2 para generar 2 isoformas, una isoforma corta de 415 aa (D2S) y una isoforma larga de 444 aa (D2L), cuyos pesos moleculares teóricos son de 47 y de 50 kDa, respectivamente (Giros y col., 1989). Ambas secuencias se originan a partir de un solo gen formado por 8 exones, donde el exón 1 codifica una secuencia que no es traducida. La formación de la isoforma corta se produce por la pérdida del exón 6 que genera una diferencia de 29 aa con la isoforma larga dentro del tercer lazo intracitoplasmático, el cual ha mostrado ser crítico para la interacción con sus efectores intracelulares (Monsma y col., 1989). Al año siguiente de la clonación del receptor D2 en rata, fue clonada la isoforma humana del receptor D2 a partir de una biblioteca de cDNA de hipófisis (Grandy y col., 1989). El receptor presentó una identidad del 96% con su homólogo de rata y además, se corroboró el evento de procesamiento alternativo descrito inicialmente en rata. Ambas isoformas se co-expresan en los tejidos, sin embargo, se han encontrado considerables variaciones en su proporción, donde la isoforma D2L es predominante en hipófisis, estriatum y tubérculo olfatorio, mientras que la isoforma D2S es más abundante en el hipotálamo y sustancia negra, sugiriéndose que podrían tener diferentes funciones (Montmayeur y col., 1991). Incluso estudios que utilizan ratones expresando sólo una

isoforma del receptor D2 *in vivo*, han sugerido que en el cerebro de rata, la isoforma larga del receptor (D2L) participaría principalmente en la señalización post-sináptica regulando la fosforilación de la fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y cAMP (DARPP-32), mientras que la isoforma corta del receptor (D2S) participaría principalmente en la señalización pre-sináptica regulando la actividad de la enzima **Tirosina Hidroxilasa** y la liberación de dopamina (Lindgren y col., 2003). Por otro lado, ambas isoformas presentan el mismo perfil farmacológico, no existiendo en la actualidad agonistas o antagonistas que permitan diferenciar entre ambas isoformas (D2S y D2L), lo cual dificulta el estudio del efecto intracelular específico de cada isoforma (Bahena y col., 2000).

El mecanismo de señalización celular del receptor D2 ha sido estudiado en variados modelos que incluyen cultivos primarios y líneas celulares. La respuesta a su agonista varía de acuerdo al tipo celular estudiado siendo capaz de generar respuestas inhibitorias o estimuladoras. Es así como estudios realizados en células lactotropas (productoras de prolactina) en la hipófisis han indicado que la activación del receptor D2 por dopamina es capaz de activar canales de K⁺ hiperpolarizando la membrana celular, bloquear la activación de canales de Ca⁺² tipo L sensibles a voltaje, inhibir la producción de cAMP e inhibir la activación de proteínas quinasas activadora de mitógeno (MAPK), generando un efecto inhibitorio para la célula que se correlaciona con la inhibición de la secreción de prolactina, disminución de la transcripción génica y una baja en la proliferación celular (Albert y col., 1990), (Vallar y col., 1990), (Senogles y col., 1994), (Ohmichi y col., 1994), (Albert y col., 2002), (Banihashemi y col., 2002). Además, ratones generados sin el receptor D2 presentan un cuadro de hiperprolactinemia e

hipertrofia de la hipófisis que puede progresar a un adenoma con la edad, lo cual sugiere que el receptor D2 mantiene un control inhibitorio constante sobre la secreción de prolactina, el crecimiento y la transformación de las células lactotrofas *in vivo* (Laccarino y col., 2002). El efecto inhibitorio de dopamina sobre las células lactotropas desaparece cuando se preincuba con la toxina de *Bordetella pertussis* (PTX), demostrándose de esta manera la participación intracelular de proteínas G del tipo $G\alpha_{i/o}$, las cuales son específicamente sensibles a esta toxina (Yamane y col., 1993). Por otro lado, en células mesenquimáticas como BALB/c-3T3, células CHO (Chinese Hamster Ovary cells) o C6 de glioma, la activación del receptor D2 produce un efecto estimulador, activando a la proteína de membrana fosfolipasa-C (PLC) para generar movilización de Ca^{+2} intracelular y promoviendo la cascada de señalización MAPK. Estos eventos se correlacionan con aumento de la transcripción génica, aumento de la proliferación celular y transformación oncogénica, los cuales son sensibles a inhibición por la toxina PTX (Lajiness y col., 1993), (Luo y col., 1998), (Choi y col., 1999).

Otro tipo celular ampliamente estudiado son las neuronas debido a que distintas alteraciones de los sistemas dopaminérgicos en el SNC han sido asociados con diversas patologías neuronales severas (Chase y col., 1998), (Knable y col., 1997), (Swanson y col., 1998), (Robbins y col., 1999).

La participación del receptor D2 en el control de los movimientos coordinados fue demostrado por Balk y col., (1995), los cuales generaron un ratón deficiente del receptor D2 el que presentó una significativa baja en los movimientos espontáneos, analogándose a síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson. En la actualidad se conoce que la enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por

la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, causando una profunda reducción en la señalización mediada por dopamina. La reducción en la señal dopaminérgica es tratada con la administración de L-DOPA (precursor de dopamina), el cual tiene mayor facilidad para atravesar la barrera hemato-encefálica ya que la dopamina no puede hacerlo (a pH 7,4 el extremo amino de la dopamina está protonado y cargado positivamente, **(Figura 1, panel A)**, (Group P.S., 2000), (Hartmann y col., 2000).

Otra enfermedad neurodegenerativa relacionada con el receptor D2 es la enfermedad de Alzheimer, en la cual se ha demostrado una pérdida de receptores D2 en el hipocampo (Joyce y col., 1993), el estriatum (Pizzolato y col., 1996) y la corteza temporal (Joyce y col., 1998).

Por otro lado, la relación del receptor D2 con la esquizofrenia tuvo lugar cuando se comenzaron a utilizar antagonistas del receptor D2 (como el haloperidol) para el tratamiento farmacológico de esta patología, sustentando la hipótesis que este trastorno se debe al menos en parte a la hiperactivación de la transmisión dopaminérgica. Además, el análisis port-mortem de cerebros de pacientes con esquizofrenia mostró un aumento en la densidad de receptores de la familia D2 (Seeman y col., 1990), corroborando la participación de receptores dopaminérgicos en la etiología de la esquizofrenia (Seeman y col., 2000). Esta hipótesis dopaminérgica recibió apoyo adicional al observarse que fármacos psicoestimulantes (como cocaína y anfetaminas) aumentaban la transmisión dopaminérgica induciendo estados psicóticos con la aparición de signos esquizofrénicos, como la euforia y alucinaciones auditivas (Goldstein y col., 1992), (Bahena y col., 2000).

Además, la dopamina ha sido relacionada a conductas adictivas, donde participa en la generación del placer, reforzamiento y recompensa en el núcleo accumbens (una región en la base del estriatum) al producir una mayor activación de los receptores dopaminérgicos D2 los cuales son altamente expresados en esta región (Nestler y col., 1997), (Robbins y col., 1999), (Centonze y col., 2002).

El mecanismo molecular de cómo el receptor de dopamina D2 participa en la modulación neuronal de determinadas funciones en el SNC y cómo la alteración de su modulación puede llegar a generar una patología en particular parece ser complejo, ya que este receptor en el SNC se localiza tanto en sitios post-sinápticos como pre-sinápticos (autorreceptores). La principal función que ejerce el receptor D2 pre-sináptico es sensor el nivel de dopamina en el espacio sináptico y producir un efecto inhibitorio sobre la liberación y síntesis de dopamina cuando los niveles extracelulares son elevados. Este efecto ocurre a través de la activación de canales de K^+ produciendo hiperpolarización, inhibiendo corrientes de Ca^{+2} activadas por voltaje e inhibiendo la producción de cAMP (Bowyer y col., 1987), (Onali y col., 1989), (Bahena y col., 2000). Por otro lado, el efecto post-sináptico del receptor D2 pareciera tener efectos tanto inhibitorios como estimuladores dependiendo del tipo neuronal estudiado. Es así como algunos trabajos han demostrado que la activación del receptor D2 inhibe la actividad de la adenilato ciclasa reduciendo los niveles de cAMP (Battaglia y col 1985), (Weis y col., 1985) e inhibe la expresión de neuropéptidos como encefalina A y neurotensina (Gerfen y col., 1990), (Diaz y col., 1994). Sin embargo, el receptor D2 post-sináptico también es capaz de producir efectos estimuladores, como el incremento del cAMP intracelular, producir la translocación de la PKA $C\alpha$ e incrementar la expresión génica

mediada por la proteína de unión a elementos que responden a cAMP (CREB) (Yao y col., 2002). Además puede aumentar el Ca^{+2} intracelular generando un aumento de la actividad de calcineurina (proteína fosfatasa dependiente de Ca^{+2}) e incrementar la actividad de la señalización MAPK en neuronas del estriatum, efecto que podría implicar el acoplamiento del receptor D2 a la vía $\text{G}_q/\text{PLC}_\beta$ y también a la activación de la PKC y la proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} /calmodulina (CaMK), (Nishi y col., 1997), (Yan y col., 1999).

Todos estos antecedentes de señalización en conjunto parecen indicar que la respuesta a nivel celular producida por la activación del receptor D2, es dependiente de la expresión específica de proteínas transductoras de señales que se acoplan diferencialmente al receptor y que generan una respuesta global en la célula que puede diferir de acuerdo al tipo celular estudiado.

Receptor de dopamina D2, activación de la vía PI3K-Akt y viabilidad celular.

El temprano uso de precursores de dopamina (L-DOPA) y agonistas dopaminérgicos en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson llevó a pensar que un mecanismo adicional a la reposición de los niveles de dopamina podía involucrar un efecto sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas. Es así como algunos estudios indicaron que agonistas dopaminérgicos podían proteger a las neuronas dopaminérgicas en modelos *in vitro* e *in vivo*, proponiéndose mecanismos que incluían el ahorro de L-DOPA, efectos antioxidantes directos y estimulación de autorreceptores (Olanow y col., 1998). Sin embargo, estudios adicionales demostraron que el efecto protector de los agonistas dopaminérgicos era eliminado cuando en los tratamientos de

protección se coadministraba con antagonistas del receptor D2, sugiriéndose que la activación del receptor D2 podía contribuir al efecto neuroprotector observado en estos modelos (Takashima y col., 1999), (Lida y col., 1999).

Otro modelo *in vitro* de neurodegeneración es la utilización del neurotransmisor excitatorio glutamato, el cual ha sido asociado a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y a procesos de isquemia, induciendo muerte neuronal (Choi y col., 1990), (Beal MF., 1992), (Kihara y col., 2001). Por otro lado, se tenían antecedentes que la estimulación con dopamina del receptor D2 era capaz de activar la quinasa involucrada en proliferación celular p70 S6, la cual es un efector río abajo de la fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K), sugiriéndose que el receptor D2 era capaz de activar la vía PI3K anteriormente descrita para factores de crecimiento y hormonas como la insulina (Welsh y col., 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes, Kihara y col., (2002), realizaron un estudio utilizando un cultivo primario de neuronas corticales de rata, el cual fue sometido al efecto tóxico de glutamato 100 μ M produciendo una muerte neuronal cercana al 70%. La incubación del cultivo primario con agonistas del receptor D2 previa a la exposición con glutamato redujo la muerte neuronal hasta cerca del 20%. El uso de antagonistas específicos del receptor D2 o inhibidores de la quinasa PI3K, suprimieron el efecto neuroprotector mostrado por los agonistas del receptor D2 frente a glutamato, demostrándose de esta manera que la activación del receptor D2 produce un efecto neuroprotector contra la toxicidad del glutamato y que la vía PI3K está involucrada en este proceso. Con el objetivo de determinar el mecanismo involucrado en la neuroprotección del receptor D2 se analizaron efectores río abajo de la quinasa PI3K. Uno de estos efectores es la

proteína quinasa serina/treonina Akt o PKB, la cual participa en procesos de supervivencia celular aumentando la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Adams y col., 1998) y fosforilando e inhibiendo a proteínas pro-apoptóticas como BAD y caspasa-9 (Datta y col., 1999). Los estudios de Kihara y col., (2002) demostraron que la activación del receptor D2 era capaz de activar la proteína quinasa Akt y aumentar la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, eventos que fueron inhibidos al utilizar inhibidores de la proteína PI3K, sugiriendo la participación de esta vía en la activación de Akt.

En un estudio similar, pero realizado con un cultivo primario de neuronas obtenidas del estriatum, se demostró también la activación de Akt por la estimulación del receptor D2, pero a diferencia de los trabajos realizados por Kihara y col., 2002 en neuronas corticales, la activación de la proteína Akt en neuronas de estriatum pareciera ocurrir por un mecanismo independiente de la proteína PI3K, ya que la activación de Akt no fue inhibida al utilizar inhibidores de la vía PI3K. Al contrario, al utilizar inhibidores de la proteína quinasa activadora de mitógeno (MEK) se logró inhibir la activación de Akt, sugiriéndose la participación de la cascada de señalización Ras/Erk, vía clásicamente asociada con proliferación y supervivencia celular (Brami-Cherrier y col., 2002).

Además de los estudios realizados con cultivos primarios de neuronas, se han realizado estudios de protección utilizando líneas celulares dopaminérgicas como las células PC12 (células cromafines de la médula adrenal) que no expresan el receptor D2 y células SN4741 (línea de sustancia negra) que en forma endógena expresan el receptor D2. Los estudios de Nair y col., (2003), demostraron que agonistas del receptor

D2 eran capaces de proteger a células PC12 establemente transfectadas con el receptor D2 del efecto tóxico producido por H_2O_2 . El efecto protector no fue observado al estimular células PC12 sin transfectar. El mismo efecto protector contra el H_2O_2 fue observado cuando las células SN4741 fueron estimuladas con agonistas específicos del receptor D2, sin embargo, el efecto no fue observado al co-estimular con antagonistas del receptor D2, sugiriendo que la activación del receptor es necesaria para la protección contra el H_2O_2 . La última evidencia encontrada fue que en ambas líneas celulares el efecto protector fue totalmente eliminado al utilizar inhibidores de la vía PI3K, sugiriéndose una vez más la participación de esta proteína quinasa (PI3K) en el efecto protector de la activación del receptor D2 (Nair y col., 2003).

Sistema reproductivo masculino y producción de espermatozoides

El sistema reproductor masculino está compuesto por los testículos (encargados de la producción de espermatozoides y hormonas sexuales masculinas), los conductos genitales (encargados de transportar a los espermatozoides al epidídimo y a la uretra), el epidídimo (encargado de la maduración espermática), las glándulas accesorias como la vesícula seminal, próstata y glándulas de Cowper (encargadas de secretar el líquido seminal que en conjunto con los espermatozoides forman el semen) y el pene (encargado de transportar a los espermatozoides al interior del sistema reproductor femenino) (Ganong WF., 2000).

Los testículos a su vez están compuestos por los túbulos seminíferos (donde ocurre la espermatogénesis y la espermiogénesis) y las células de Leydig localizadas

entre los túbulos seminíferos y encargadas de la producción de testosterona y factores de crecimiento (Zirkin y col., 2000).

El interior de los túbulos seminíferos está compuesto por 2 tipos celulares: las células germinales, que darán origen a los espermatozoides y las células de Sertoli que brindan soporte, nutrición y protección (a través de la barrera hemato-testicular) a las células germinales (Mruk y col., 2004).

El proceso de proliferación y diferenciación de las células germinales comienza cuando la espermatogonia (localizada en la membrana basal del túbulo seminífero) madura a espermatocono primario, los cuales entran en meiosis para duplicar su material genético ($4n$) y experimentar la recombinación genética entre cromátidas hermanas. Posterior a esto, los espermatoconos primarios se dividen, dando origen a los espermatoconos secundarios ($2n$) que son muy difíciles de visualizar en preparaciones histológicas debido a que inmediatamente entran en la segunda división meiótica para dar origen a las espermátidas, células que tienen un número haploide (n) de cromosomas y que se encuentran ubicadas hacia el lumen del túbulo seminífero. Este proceso de diferenciación de espermatogonia a espermátida es conocido como espermatogénesis (**Figura 2, panel A**) (Roosen-Runge, 1977), (Holstein y col., 2003).

Una vez terminado el proceso de espermatogénesis comienza inmediatamente el proceso de espermiogénesis. Este proceso involucra una serie de modificaciones complejas que sufre la espermátida. El complejo de Golgi dará origen a una estructura vesicular que se desplazará en dirección al núcleo y que terminará uniéndose y cubriendo parte de su superficie para generar el casquete acrosómico.

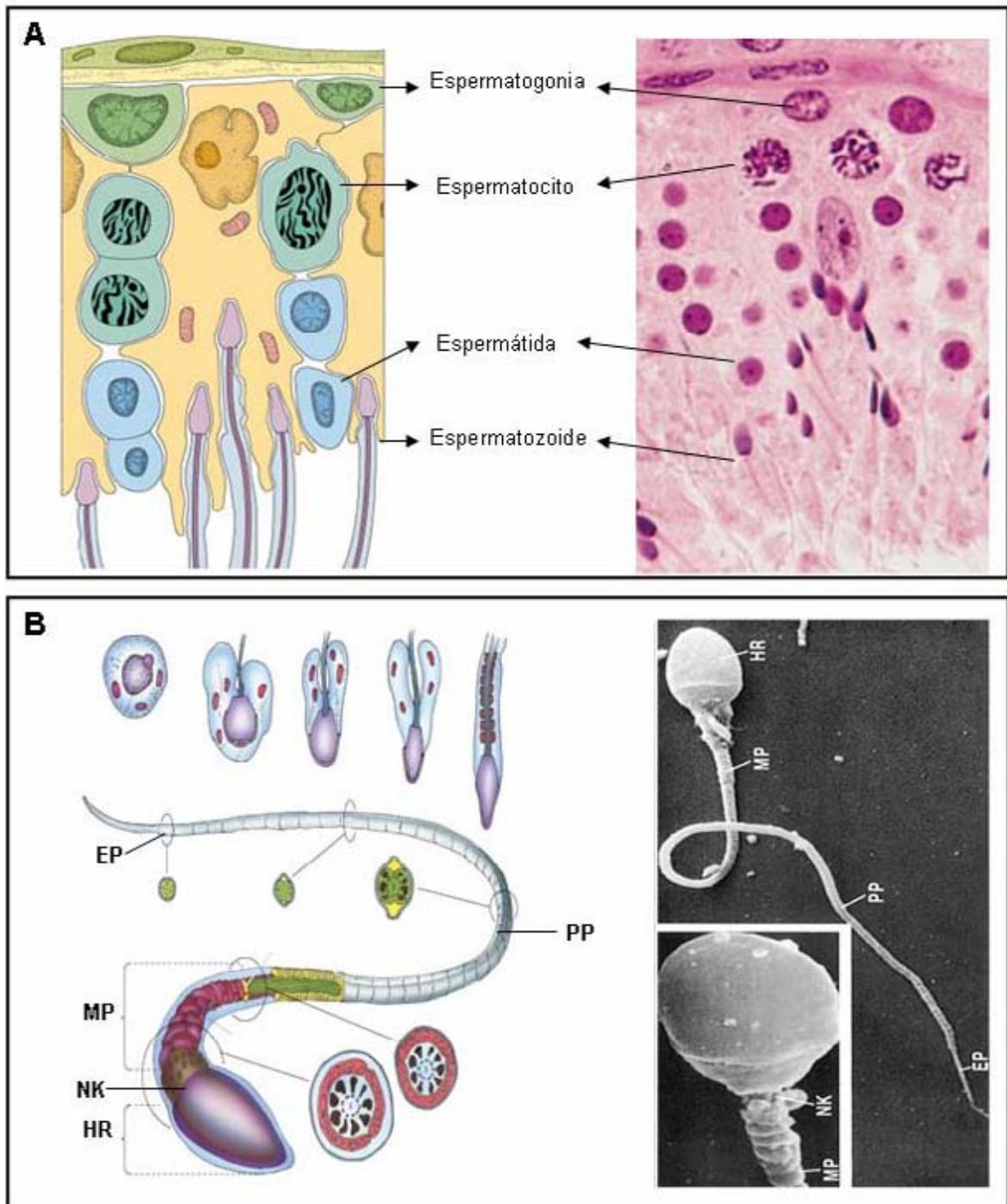


Figura 2: El túbulo seminífero y la producción de espermatozoides: A) Células germinales presentes en el túbulo seminífero. B) Morfología del espermatozoide: cabeza (HR), cuello (NK), pieza media (MP), pieza principal (PP), pieza terminal (EP). (Gartner y col., 2002).

Simultáneamente los centríolos migran hacia el polo opuesto para dar origen al flagelo donde los microtúbulos se organizan para formar el axonema, el que tiene una estructura tubular compuesta por 2 microtúbulos centrales y nueve pares periféricos. El núcleo se alarga y aplanan y la cromatina se condensa. Las mitocondrias migran hacia la región inicial del flagelo para formar la vaina mitocondrial de la pieza media del espermatozoide. El citoplasma con sus organelos residuales se desplazan hacia la región caudal donde formará un cuerpo residual que será fagocitado por las células de Sertoli. Una vez terminado el proceso de espermiogénesis, los espermatozoides tendrán características morfológicas típicas de cada especie, pero que conservan un patrón morfológico común (**Figura 2, panel B**). Finalmente, su capacidad motriz la adquirirá después de permanecer almacenado en el epidídimo donde terminará su proceso de maduración (Hecht, 1995).

A pesar del complejo proceso de espermiogénesis y maduración en el epidídimo, el espermatozoide de mamífero maduro aún no es capaz de fecundar al ovocito, para esto deberá sufrir en el tracto genital femenino un proceso conocido como "capacitación". En este proceso se producen una serie de cambios bioquímicos en el espermatozoide que involucran pérdida de colesterol de la membrana plasmática, aumento en el cAMP intracelular, activación de la proteína quinasa A, aumento en la fosforilación de proteínas en tirosinas, hiperpolarización de la membrana plasmática y elevación del pH intracelular (entre otros). Finalmente se produce un cambio en el patrón de motilidad del espermatozoide generando un patrón de "hiperactivación" y la habilitación del espermatozoide para experimentar la reacción acrosomal. Estos eventos en conjunto permiten que procesos claves para la continuidad de la vida

puedan ocurrir, como la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida y la posterior fecundación del ovocito (Visconti y col., 1998), (Ho y col., 2001).

Sistema reproductivo masculino y catecolaminas

El normal funcionamiento de las gónadas de mamíferos es dependiente de las hormonas gonadotróficas LH y FSH que son producidas en la hipófisis anterior y reguladas por el hipotálamo a través de la producción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH). En los testículos, la hormona LH actúa directamente sobre las células de Leydig estimulando la producción de testosterona, hormona esteroideal que difunde al interior de los túbulos seminíferos y actúa sobre las células de Sertoli, que en conjunto con la hormona FSH mantienen la continua producción de espermatozoides (Walter y col., 2005).

Este complejo proceso de producción de espermatozoides haploides que involucra proliferación y diferenciación celular regulado principalmente por las hormonas gonadotróficas, también está sujeto a las influencias de la producción local de factores de crecimiento e incluso de neurotransmisores (Gnessi y col., 1997), (Mayerhofer y col., 1999a). En particular, neurotransmisores como las catecolaminas podrían formar parte de este “complejo estimulador neuroendocrinotrófico”, ya que se ha descrito la presencia de catecolaminas (entre ellas dopamina) en los fluidos intersticiales del testículo (Campos y col., 1990). Estas catecolaminas pueden llegar al testículo a través de la inervación simpática o por el torrente sanguíneo después de ser sintetizadas y liberadas a la sangre por las células cromafines de la médula adrenal, (Mayerhofer y col., 1996), (Prince, 1996), (Lakomy y col., 1997). Además, células similares a neuronas

expresando **Tirosina Hidroxilasa**, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, fueron recientemente identificadas en testículos de monos rhesus y humanos, siendo una potencial fuente de síntesis de dopamina testicular (Mayerhofer y col., 1999b), (Frungieri y col., 2000). Además de estos antecedentes, los estudios de Romero y col., (2004), demostraron también el fenotipo catecolaminérgico de las células de Leydig, sugiriendo una fuente intratesticular de catecolaminas que en conjunto con la fuente neuronal y la que llega vía sanguínea, pudieran estar involucradas en la regulación de la espermatogénesis.

Por otro lado, en el sistema reproductor femenino se han descrito células similares a neuronas expresando **Tirosina Hidroxilasa** (Dees y col., 1995) y se han detectado niveles de dopamina en líquido antral de folículos de porcinos y humanos pre-ovulatorios (Bahr y col., 1985), (Bodis y col., 1993). Estudios funcionales realizados con células de cuerpo lúteo humano, demostraron que la dopamina es capaz de aumentar la fosforilación de DARPP-32 actuando a través del receptor D1 (Mayerhofer y col., 2000). Además, estudios realizados con tejido ovárico equino demostraron la expresión de receptores de dopamina tipo D1 y D2 y el tratamiento con agonistas y antagonistas es capaz de afectar la función reproductiva ovárica, sugiriendo que dopamina puede actuar directamente sobre el órgano reproductivo femenino a través de dos tipos de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) (King y col., 2005). La presencia de receptores de dopamina en el tejido ovárico, podría indicar que dopamina pudiera estar modulando funciones celulares posiblemente a través de mecanismos también presentes en el tejido reproductivo masculino.

La dopamina, ha sido vinculada con un rol crítico en el comportamiento sexual y la erección del pene actuando en el cerebro sobre varios núcleos del hipotálamo y el mesencéfalo (Sato y col., 1995). Dopamina y apomorfina (un agonista D1 y D2) son capaces de inducir erección peniana en humanos y en ratas actuando posiblemente como un iniciador central de la erección e intensificando el estímulo pro-eréctil (Heaton y col., 2000). En estudios realizados con ratas machos se observó que bajos niveles de estimulación dopaminérgica (vía receptores D1) incrementan la erección y niveles más elevados o la estimulación prolongada (vía receptores D2) producen la emisión seminal (Hull y col., 1992). Con el objetivo de explorar la posibilidad que además de la acción central, dopamina pudiera tener un efecto a nivel local, Hyun y col., estudiaron la presencia de receptores dopaminérgicos en el pene y glándulas accesorias. Sus trabajos demostraron simultáneamente la expresión de receptores tipo D1 y D2 en la vesícula seminal de rata y humano (Hyun y col., 2002a) y en el cuerpo cavernoso del pene de rata (Hyun y col., 2002b). En ambos trabajos los receptores fueron asociados a la musculatura lisa tanto del pene como de las vesículas seminales, sugiriéndose que el efecto pro-eréctil y la emisión seminal pudieran ser mediados en parte por la estimulación de estos receptores dopaminérgicos periféricos.

La inesperada expresión de receptores específicos de neuronas en células somáticas fuera del sistema nervioso central plantea la posibilidad que muchos de estos receptores originalmente descritos en neuronas puedan estar cumpliendo funciones similares o completamente distintas a las descritas inicialmente dependiendo del tipo celular en donde se expresen. Uno de estos tipos celulares que pareciera compartir varios de estos receptores neuronales son los espermatozoides, en los cuales se han

descrito receptores para neurotransmisores como GABA, glicina, acetilcolina, glutamato, adenosina, noradrenalina, angiotensina y anandamida entre otros (Meizel, 2004). Además, varios de estos agonistas han sido detectados en fluido oviductal y diversos estudios funcionales los han correlacionado con mecanismos exocíticos que parecieran compartir con las neuronas o bien estar relacionados con funciones únicas del espermatozoide como el proceso de capacitación y motilidad (Meizel, 2004). Al igual que algunos neurotransmisores nombrados anteriormente, la dopamina ha sido detectada en fluido oviductal, sugiriendo que los receptores de dopamina podrían tener alguna participación en la fisiología reproductiva masculina (Kotwica y col., 2003).

Finalmente, basados en los antecedentes expuestos y que se resumen a continuación:

- La importancia de los receptores de dopamina en el Sistema Nervioso Central.
- La inesperada presencia de estos receptores en tejidos reproductivos.
- La sorprendente presencia de receptores neuronales en los espermatozoides.
- La presencia y síntesis de dopamina en el testículo.
- La presencia de dopamina en el fluido oviductal.
- La activación de la vía PI3K-Akt por el receptor D2 favoreciendo la viabilidad celular.

Y sumados a la evidencia preliminar obtenida por nuestro laboratorio de la posible presencia del receptor D2 en línea germinal masculina de rata, sustentan la postulación de la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“El receptor de dopamina D2 se expresa en línea germinal masculina y su activación es capaz, entre otros efectos, de proteger a las células espermatogénica frente a estímulo tóxicos como el H₂O₂ a través de la activación de la vía PI3K-Akt”.

Objetivo general

Estudiar la expresión y función del receptor de dopamina D2 en las células espermatogénicas del testículo de rata.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión del mRNA del receptor D2 en testículo de rata a través de análisis de RT-PCR utilizando partidores específicos.
- Detectar la presencia del receptor D2 en cortes de testículo y células aisladas de rata (espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) y en espermatozoides de toro y humano por estudios de inmunohisquímica utilizando anticuerpos específicos.
- Corroborar la presencia del receptor D2 en los extractos proteicos de testículo y células aisladas utilizando análisis de Western blot.
- Determinar el efecto de dopamina sobre la viabilidad espermática y el efecto protector de dopamina después de la acción tóxica de un inductor de radicales libres (estrés oxidativo) como el peróxido de hidrógeno.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico:

En este estudio se utilizaron cortes de testículo y espermatozoides de epidídimo de rata (*rattus norvegicus*) cepa Sprague-Dawley, las que fueron proporcionadas por el vivero del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Los espermatozoides de bovino utilizados se obtuvieron de eyaculados frescos proporcionados por el Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile. Los espermatozoides humanos fueron proporcionados por donantes jóvenes y saludables y el semen fue colectado en contenedores de plástico estériles (Angulo y col., 1998), (Zambrano y col., 2001). La aprobación ética se obtuvo a través de una carta de consentimiento de acuerdo a la reglamentación vigente del Comité de Ética de la Universidad Austral de Chile. Como control positivo, se utilizaron cerebros de ratas Sprague-Dawley, también proporcionados por el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Reactivos químicos:

De **Sigma Chemical Co.** se obtuvieron los siguientes reactivos: gelatina de piel de bovino, 2-mercaptoetanol, glicina, azul de Coomassie G-250, Tritón X-100, albúmina de suero de bovino (BSA), ortovanadato de sodio, fluoruro de sodio, poli-L-lisina (peso molecular > 350 kDa), L-glutamina, Tween 20.

De **Merck, Darmstadt**, fueron adquiridos los siguientes reactivos: ácido clorhídrico, fosfato ácido de sodio, glicerol, ácido acético, hidróxido de sodio, PMSF, sulfato de cromo III y potasio, xilol, y azul de bromofenol, cloruro de potasio, citrato de sodio dihidratado, fosfato ácido de sodio dihidratado, fosfato diácido de potasio, HEPES sal sódica, azul de bromofenol, etanol, isopropanol, formaldehído y formamida.

De **PIERCE** fueron adquiridos los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón y anti IgG de conejo.

De **Boehringer Mannheim GmbH**, se obtuvieron los siguientes reactivos: leupeptina, aprotinina, pepstatina A, inhibidor de tripsina, 3,3` diamino bencidina (DAB).

De **MBI Fermentas**, fue obtenido el estándar de peso molecular preteñido para geles de poliacrilamida-SDS.

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc.** se obtuvieron membranas de nitrocelulosa, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, TEMED, DTT, tripsina, medio neurobasal y medio nutritivo Ham`s F-12.

De **DAKO** fue adquirido Quick Staining Kit[®] HRP, peroxidasa policlonal.

De **Santa Cruz Biotechnology** se obtuvieron los siguientes anticuerpos: anti-receptor de dopamina tipo D2 humano policlonal hecho en conejo (H-50), anti-receptor de dopamina tipo D2 humano monoclonal hecho en ratón (B-10), anti-subunidad catalítica de PI3K p110 β (H-239), anti-BAD (H-168), anti-caspasa-9 p10 (H-83), anti-p-Akt (Thr-308; sc-16646), anti-p-Akt (Ser-473; sc-7985).

De **Molecular Probes**, Anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a Alexa fluor 594 (rojo) y el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488 (verde).

De **PROMEGA** se obtuvieron la transcriptasa reversa, Taq DNA polimerasa, desoxinucleótidos, agarosa y persulfato de amonio.

De **BIOS Chile IGSA** se obtuvieron los oligonucleótidos utilizados como partidores, las secuencias fueron obtenidas de Wang y col., (2000) donde el partidor sentido es complementario al exón 5 de gen del receptor D2 (5'-GAG TGT ATC ATT GCC AAC CCT GCC-3') y el partidor antisentido es complementario al exón 7 del gen del receptor D2 (5'-TGG TGC TTG ACA GCA TCT CC-3').

De **Whatman Internatonal Ltd.**, se utilizó papel filtro N° 1, de **Amresco**, Histochoice tissue fixative MB e Histochoice Histological Mounting Medium, de **Citoseal™** bálsamo para montar los cortes, de **LabGuard Mallinckrodt**, se obtuvo cloruro de sodio, de **Amersham Pharmacia Biotech** se obtuvo ECL Western blotting, y el material fotográfico utilizado fue obtenido de **Kodak**.

El equipo utilizado fue el siguiente: Centrífuga Hereus Megafuge 1.0R, centrífuga Eppendorf 5417-R, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company y DESAGA desatronic 1000/200, agitador magnético IKAMAG® RCT, espectrofotómetro Shimadzu UV-120-12, contador de centelleo líquido Packard tri-Carb 1600TR, termociclador Mini Cycler TM MJ RESEARCH, transiluminador UVP, pHmetro Radiometer Copenhagen

PHM 83 Autocal, cámara de Neubauer, balanza precisa 180A, sistema de electroforesis y transferencia Mini Protean[®] III y Mini Trans Blot de BIO RAD, agitador orbital LAB-LINE, baño termorregulado Haake D8, microscopio ZEISS modelo Axioskop 2 acoplado a una cámara digital Nikon DXM1200, microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000.

3.2. METODOS

3.2.1 Uso de animales de experimentación.

Las ratas proporcionadas por el vivero del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, mantenidas de acuerdo a la normativa vigente, fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por dislocación cervical según las medidas de bioseguridad del “Manual de Normas de Bioseguridad” de CONICYT de 1994. Los restos fueron cremados en el incinerador del Fundo Teja Norte de la Universidad Austral de Chile, donde se descartan los desechos biológicos de acuerdo al “Manual de Procedimiento para el Manejo de Residuos” de la Universidad Austral de Chile disponible en la intranet.

3.2.2 Cultivo primario de neuronas.

Para el cultivo primario, las neuronas fueron obtenidas de la corteza cerebral de embriones de ratas Sprague-Dawley de 17 días de edad. Después de remover el cerebro medio, la corteza cerebral fue digerida por 15 minutos con tripsina al 0,12% p/v en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Luego de ser triturada y completamente homogenizada con una pipeta Pasteur, las neuronas fueron sembradas sobre placas de cultivo cubiertas con poli-L-lisina (peso molecular > 350 kDa) e incubadas por 20 minutos. Después de este tiempo, las células flotantes fueron eliminadas y las células unidas cultivadas por 5 días en medio neurobasal suplementado con L-glutamina.

3.2.3 Extracción de RNA total.

El RNA se obtuvo de tejido de cerebro, cultivo primario de neuronas y testículo de ratas Sprague-Dawley utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y aproximadamente 100 mg de tejido o una placa de cultivo de neuronas fueron homogeneizados en 1 ml de solución de lisis (tiocianato de guanidina 4 M, sarcosil 0,5%, 2-β-mercaptoetanol 0,1 M, citrato de sodio 25 mM (pH 7,0)). Luego, la mezcla fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas y a continuación se agregaron 0,1 volumen de acetato de sodio 2 M, 1 volumen de fenol saturado en agua y 0,2 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), agitando vigorosamente después de agregar cada solución. Posteriormente se centrifugó la mezcla resultante a 10.000 xg por 20 minutos a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, volviéndose a tratar con fenol y cloroformo. El sobrenadante acuoso conteniendo el RNA, fue tratado con 1 volumen isopropanol frío y se dejó precipitar por 2 horas a -20°C. Luego, el RNA fue recuperado por centrifugación a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C y el pellet fue lavado con 1 volumen de etanol 75% y centrifugado a 5.000 xg por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el RNA fue resuspendido en 500 µl de agua estéril donde luego se agregó 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol frío, y se dejó precipitar por 2 horas a -20°C. Luego se centrifugó a 15.600 xg durante 30 minutos a 4°C y el precipitado se lavó 3 veces con etanol 75% agitando suavemente y centrifugando a 5.000 xg por 5 minutos. Finalmente, después del último lavado, el pellet fue secado a temperatura ambiente por 5 minutos y resuspendido en 50 µl de agua estéril libre de RNAsas. Para determinar la concentración y pureza del RNA se tomó

una alícuota de la muestra, se diluyó 150 veces y se leyó la absorbancia a 260 y 280 contra un blanco de agua estéril. Para el cálculo de la concentración se supuso que una unidad de absorbancia a 260 es equivalente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA. Las preparaciones de RNA así obtenidas mostraron una razón de absorbancia 260/280 en el rango de 2,0-2,2.

3.2.4 Electroforesis en geles de agarosa/formaldehído.

Para confirmar la integridad de la preparación de RNA obtenida se prepararon geles de agarosa al 1,5% en tampón MOPS 5X (MOPS 0,2 M pH 7,0, acetato de sodio 50 mM, EDTA 5mM pH 8,0) conteniendo formaldehído 2,2 M. Se utilizaron 20 μg de la muestra de RNA homogeneizado en tampón MOPS 5X conteniendo formaldehído y formamida con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. La muestra se incubó por 15 minutos a 55°C. Se utilizó tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4% y cianol de xileno al 0,4 %) en relación 1:10 con respecto al volumen de la muestra. Posteriormente el gel fue visualizado por exposición a la luz UV en un transluminador.

3.2.5 Síntesis del cDNA.

La reacción de RT para la síntesis del cDNA fue realizada en un volumen final de 20 μl y se utilizaron 2,0 μg de RNA total de cada muestra (cultivo de neuronas, cerebro y testículo de rata), el que fue incubado con 200 unidades de transcriptasa reversa (PROMEGA Inc.), 1 mmol/l de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,5 μg de oligo dT, KCl 75 mM, ditiotreitól 10 mM, MgCl_2 3 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,3). La mezcla final de reacción fue incubada en un termociclador a 42°C por 50 minutos seguida de

una incubación a 70°C por 15 minutos, para la inactivación de la enzima. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20°C para su posterior amplificación por PCR.

3.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1 μ mol/l de partidores sentido y antisentido, $MgCl_2$ 3 mM, 1 mM de cada dNTP, 2,5 μ l de tampón 10X, 5 μ l de cDNA templado y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (PROMEGA Inc.). La mezcla final de reacción fue incubada a 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos por 35 ciclos. Los productos de amplificación obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz UV en un transluminador. La secuencia de los partidores utilizados en la reacción de PCR fue previamente descrita por Wang y col., 2000 y son complementarias al exón 5 en el primer sentido (5'-GAG TGT ATC ATT GCC AAC CCT GCC-3') y al exón 7 en el primer antisentido (5'-TGG TGC TTG ACA GCA TCT CC-3'), lo que permite diferenciar claramente entre las 2 isoformas del receptor D2 (D2L y D2S) por el tamaño del producto de PCR generado (D2L= 321 pb y D2S= 234 pb).

3.2.7 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de rata.

La localización del receptor de dopamina tipo D2 fue determinada por estudios de inmunohistoquímica en cortes de testículo de rata fijados en parafina de machos pre-púberes (6 días de edad) y adultos (60 días de edad). Para eliminar la parafina e hidratar el tejido, se incubó la muestra en xilol por 3 minutos (2 veces), seguida de la

incubación en etanol 100% por 3 minutos (2 veces), etanol 95% por 3 minutos (2 veces) y agua destilada por 3 minutos (2 veces). Posteriormente, los cortes fueron sometidos a un tratamiento para mejorar la exposición de los antígenos que consistió en incubar la muestra con citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en un horno microondas, 1 minuto a 100% de potencia, 10 minutos a 10% de potencia y 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de citrato se lavó con agua destilada dos veces por 5 minutos. Posteriormente, los cortes fueron tratados con H₂O₂ 3% por 5 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar la actividad peroxidasa endógena del tejido. El exceso de H₂O₂ es eliminado pasando el tejido por agua destilada y posteriormente incubando en PBS 1X (NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 15 mM pH 7,4) por 5 minutos. Luego, los cortes fueron bloqueados por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con solución de PBS 1X conteniendo BSA 1%, leche descremada 5% y Triton X-100 al 0,3% (solución de bloqueo). Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C en cámara húmeda con anticuerpo anti-D2R policlonal (sc-91113/H-50; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50 en solución de PBS 1X conteniendo BSA 1%, leche descremada 5% y Triton X-100 0,3%. El control negativo fue hecho incubando uno de los cortes por toda la noche en solución de bloqueo sin anticuerpo. La incubación del segundo anticuerpo y el revelado fue realizado utilizando el sistema DAKO® *Quick Staining Kit HRP*. Esta técnica se basa en que las muestras luego de ser incubadas con el primer anticuerpo, son tratadas con una solución que contiene IgG de conejo biotinilada para luego ser incubadas con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa. La reacción se completa al incubar con un sustrato cromógeno, y la

reacción de color es desarrollada usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), dando como resultado un precipitado insoluble en el sitio del antígeno.

Finalmente, se procedió a la deshidratación de los cortes utilizando etanol al 80% y 100%, se incubó 1 minuto en cada solución. Luego los cortes se incubaron 2 veces en xilol por 5 minutos, y posteriormente se montaron usando Citoseal™ y cubreobjetos, para ser observados bajo microscopía óptica a 100X y 250X de magnificación en un microscopio de marca ZEISS acoplado a una cámara digital Nikon DXM1200. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop 7,0.

3.2.8 Separación de células germinales de testículo de rata.

La preparación de células se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Berríos y col., (1998). Tres ratas macho de 30 a 35 días de vida se sacrificaron por dislocación cervical. Los testículos extraídos fueron descapsulados y depositados en un matraz Erlenmeyer con 20 ml de medio Krebs-Henseleit (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, KH_2PO_4 1,6 mM, MgCl_2 1,6 mM y Hepes 20 mM), adicionando en el momento de usar, MgCl_2 0,5 mM y lactato 10 mM, además colagenasa 0,5 mg/ml y DNAsa 2 $\mu\text{g/ml}$. Luego de agitación, en un baño termorregulado a 33°C con una concentración de O_2/CO_2 de 95/5% por 20 minutos, se obtuvieron los túbulos seminíferos disgregados. Se realizaron 3 lavados por decantación, con 10 ml del medio Krebs-Henseleit (KH) (conteniendo MgCl_2 0,5 mM y lactato 10 mM) cada uno. Para poder romper los túbulos seminíferos, se agitaron primero por 2 minutos en el baño termorregulado a 33°C con O_2/CO_2 de 95/5%, agregando 10 ml del medio Krebs-Henseleit (conteniendo MgCl_2 0,5 mM,

lactato 10 mM y además tripsina 0,2 mg/ml y DNAsa 10 mg/ml), luego con ayuda de una pipeta plástica, evitando producir burbujas, los túbulos fueron rotos mecánicamente. De este modo, las células fueron filtradas en rejilla doble de 50 a 70 μm y algodón, siendo recolectadas en un tubo Falcon. Al ser filtradas, las células son centrifugadas por 3 minutos, siendo lavadas 3 veces en Krebs-Henseleit (conteniendo calcio 0,5 mM y lactato 10 mM). Después del último lavado, el sedimento celular es resuspendido y se depositan en una gradiente lineal de BSA 1,5-3,5% en medio Krebs-Henseleit (adicionado con calcio 0,5 mM y lactato 10 mM) el cual se deja sedimentar por 3 horas. Una vez sedimentadas, se colectan de la gradiente 80 fracciones de 4 ml cada una y las células son visualizadas bajo el microscopio óptico, siendo elegidas las fracciones que contienen espermátocitos puros y por otro lado las fracciones que contienen espermátidas puras, diferenciándolas por tamaño y forma. En este caso, los espermátocitos fueron encontrados en las fracciones 10 – 15 y las espermátidas en las fracciones 50 - 55. Las respectivas fracciones de espermátocitos y espermátidas fueron colectadas en tubos Falcon y posteriormente lavados 3 veces con el medio Krebs-Henseleit (conteniendo calcio 0,5 mM y lactato 10 mM) por 3 minutos a 1400 xg.

Las preparaciones de espermátocitos y espermátidas aisladas así obtenidas, fueron utilizadas para análisis posteriores.

3.2.9 Inmunocitoquímica en esparcidos de espermátocitos y espermátidas de testículo de rata.

Sobre portaobjetos previamente lavados y cubiertos con una solución de gelatina de piel de bovino al 5% y sulfato de cromo III y potasio al 0,05%, se colocaron

10 μ l de cada mezcla de espermatoцитos y espermátidas. Luego se fijó cada muestra utilizando una solución de Histochoice en etanol 4:1, durante 10 minutos. Enseguida los esparcidos fueron incubados en cámara húmeda por 5 minutos con peróxido de hidrógeno al 3%, y luego lavados con PBS 1X (NaH_2PO_4 15 mM pH 7,4, NaCl 150 mM), para proceder posteriormente a bloquear cada muestra utilizando una solución conteniendo leche descremada 5%, BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en tampón fosfato salino, PBS 1X pH 7,4, incubado durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego, las muestras fueron incubadas con 100 μ l de anticuerpo anti-D2R policlonal (sc-9113/H-50; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50 en solución de bloqueo e incubándose durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Los procedimientos de lavado, incubación con el segundo anticuerpo y revelado fueron realizados como se describe en la sección 3.2.7.

3.2.10 Obtención de espermatozoides de rata, bovino y humano.

Los espermatozoides de rata fueron obtenidos según el procedimiento descrito por Vera y col., (1984). Para ello, ratas sexualmente maduras de aproximadamente 60 días de edad, fueron anestesiadas con cloroformo y posteriormente sacrificadas por dislocación cervical. El epidídimo fue cuidadosamente disectado del testículo, asegurándose de eliminar la mayor cantidad posible de tejido graso, y se transfirió a un vaso precipitado que contenía PBS 1X (NaCl 150 mM, NaH_2PO_4 15 mM (pH 7,4)) más PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas. Posteriormente, el epidídimo fue cortado en trozos pequeños con el objeto de lograr la máxima difusión de los espermatozoides a la solución. Luego, la suspensión obtenida fue filtrada a través de una malla de nylon de

200 μm y 100 μm de poro respectivamente, recuperándose los espermatozoides por centrifugación a 600 $\times g$ por 5 minutos a 4°C. El sedimento de espermatozoides fue resuspendido y lavado 3 veces con PBS 1X más PMSF 1 mM. Los espermatozoides de rata así obtenidos fueron utilizados en los experimentos posteriores.

Para obtener espermatozoides aislados de bovino y humano, se utilizó semen fresco de toro y donantes humanos voluntarios (en el caso de semen humano, este se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente antes de manipularlo con el objetivo de facilitar su licuefacción). En ambos casos, el semen obtenido fue lavado 4 veces con PBS 1X mas PMSF 1 mM y recuperados por centrifugación a 600 $\times g$. Los espermatozoides bovinos y humanos así obtenidos fueron utilizados en los experimentos posteriores.

3.2.11 Inmunocitoquímica fluorescente de espermatozoides de rata, bovino y humano.

Sobre portaobjetos previamente lavados y cubiertos con una solución de gelatina de piel de bovino al 5% y sulfato de cromo III y potasio al 0,05%, se colocaron 10 μl de cada suspensión de espermatozoides obtenidos como se describe en la sección 3.2.10. Luego se fijó cada muestra utilizando una solución de Histochoice en etanol 4:1, durante 10 minutos. Posteriormente, los espermatozoides fueron bloqueados utilizando una solución conteniendo leche descremada 5%, BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en tampón fosfato salino, PBS 1X pH 7,4 e incubado durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego las muestras fueron cubiertas con 100 μl de anticuerpo anti-D2R policlonal diluido 1:50 en solución de bloqueo y se incubaron

durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. En el caso de la detección de PI3K, Bad, Caspasa-9, p-Akt y fosfotirosina (PY20, Transduction Laboratories (Lexington, KY)), la dilución utilizada fue de 1:100. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 4 veces con tampón fosfato salino, PBS 1X pH 7,4 e incubados por 2 horas a temperatura ambiente con los segundos anticuerpos anti-IgG de conejo-conjugado a Alexa fluor 488 (color verde) o anti IgG de ratón-conjugado a Alexa fluor 596 (color rojo) ambos dilución 1:500. Finalmente, los espermatozoides fueron lavados 4 veces con PBS 1X pH 7,4 y montados en medio especial para fluorescencia. En el caso de la detección del receptor D2 y en los estudios funcionales con p-Akt, los espermatozoides fueron incubados con yoduro de propidio y analizados por microscopia confocal. Como control positivo del receptor D2, se utilizó cultivo primario de neuronas de rata, el que fue trabajado en paralelo. En la detección de las proteínas PI3K, Bad, caspasa-9 y PY20 las imágenes fueron obtenidas por microscopia de epifluorescencia.

3.2.12 Inmunocitoquímica de Akt fosforilada en espermatozoides frescos de bovino.

Espermatozoides de bovino preparados como se describe en la sección 3.2.11, fueron incubados en cámara húmeda por 5 minutos con peróxido de hidrógeno al 3%, y luego lavados con PBS 1X (NaH₂PO₄ 15 mM pH 7,4, NaCl 150 mM), para proceder posteriormente a bloquear la muestra utilizando una solución conteniendo leche descremada 5%, BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en tampón fosfato salino, PBS 1X pH 7,4 e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego, las muestras fueron incubadas con 100 µl de anticuerpo anti-p-Akt (Thr-308) y anti-p-Akt

(Ser-473) diluidos 1:50 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Los procedimientos de lavado, incubación con el segundo anticuerpo y revelado fueron realizados como se describe en la sección 3.2.7.

3.2.13 Extracción de proteína

Las muestras destinadas a la extracción de proteínas fueron homogenizadas en tampón RIPA (Triton-X-100 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH: 7,2, EDTA 5 mM más los inhibidores de proteasas; PMSF 1 mM, aprotinina 2 μ M, leupeptina y pepstatina 1 μ g/ μ l). En la extracción de proteínas totales para el análisis de proteínas fosforiladas, también se agregaron los inhibidores de fosfatasas ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 5 mM. Posteriormente, los homogeneizados fueron centrifugados a 14800 xg por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue recuperado y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para construir la curva de calibración. Los extractos proteicos así obtenidos fueron utilizados posteriormente para estudios de inmunoprecipitación e *immunoblots*.

3.2.14 Separación electroforética de proteínas

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970), en el sistema de electroforesis *Mini Protean*® *III* de la compañía BIO RAD. El gel separador y espaciador de 1,5 mm de grosor, se prepararon a partir de una solución de

acrilamida:bisacrilamida 30:0,8. El gel separador se preparó a una concentración final de poliacrilamida de 10% conteniendo Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. El gel espaciador se preparó a una concentración final de poliacrilamida de 3,8%, conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% y TEMED 0,04%. Las muestras de proteínas totales fueron mezcladas con tampón muestra 5X (SDS 5%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,05%, 50 mM DTT y Tris-HCl 0,125 M pH 6,8) e incubadas a 37°C por 10 minutos. Luego, las muestras fueron cargadas en el gel, realizándose la electroforesis en tampón de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM y SDS 0,1%) con una intensidad de corriente de 30 mA por un tiempo aproximado de 2 horas.

3.2.15 Electrotransferencia

Una vez finalizada la separación electroforética de las proteínas, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF, según lo descrito por Tsang y col (1983) en el sistema de *Mini Trans Blot*® de BIO RAD. Para esto, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1% y metanol 20%) se depositaron secuencialmente: un trozo de papel filtro Whatman Nº 1, la membrana de PVDF, el gel a transferir y luego otro papel filtro, todo lo cual se cubrió con otra esponja embebida en la misma solución. Este “sandwich” se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón de transferencia y se colocó una intensidad de corriente de 100 mA por 4 horas. Transcurrido este tiempo la membrana se dejó secar a temperatura ambiente y se guardó a 4°C para el análisis posterior.

3.2.16 Detección inmunológica

Para la detección inmunológica de las proteínas electrotransferidas, las membranas de PVDF fueron rehidratadas por el paso de metanol 100% por 10 segundos y un lavado con PBS 1X (NaH_2PO_4 15 mM pH 7,4, NaCl 150 mM). Luego fueron incubadas por 1 hora con solución de bloqueo compuesta de PBS-Tween 20-Leche (NaH_2PO_4 15 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,3% y leche descremada 5%). Posteriormente, las membranas fueron incubadas por toda la noche a 4°C bajo agitación constante con los anticuerpos respectivos diluidos en solución de bloqueo (anti-D2R diluido 1:1000, anti-p-Akt (Ser-473) diluido 1:1000, anti-p-tirosina (PY20) diluido 1:500, anti- β -tubulina (utilizada como control de carga) diluido 1:1000). Luego, las membranas se lavaron tres veces a temperatura ambiente por 15 minutos con PBS-Tween-20 (Tween-20 0,03% en PBS 1X) bajo agitación continua. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (1:5000) o ratón (1:1000) conjugados con la enzima peroxidasa y diluidos en solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces a temperatura ambiente con PBS-Tween-20 por 15 minutos y 1 vez con PBS 1X para eliminar el exceso de detergente. El revelado del conjugado se realizó usando el método de quimioluminiscencia comercial ECL (Amersham). El resultado se obtiene mezclando partes iguales de dos reactivos, produciéndose una solución de peróxido de hidrógeno y luminol que se vierte sobre las membranas, dejándose actuar por 1 minuto, luego se elimina el exceso de solución y la membrana se expone a un film que registrará la luz emitida por el luminol. Finalmente, se detiene la reacción al retirar el film de la membrana y la película obtenida se revela con el reactivo D_{72} y se fija con reactivo U_3 .

3.2.17 Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó con 500 μ g de proteínas totales obtenidas como se describe en la sección 3.2.13. Las proteínas fueron llevadas a un volumen final de 400 μ l con tampón RIPA (Triton-X-100 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH: 7,2, EDTA 5 mM más los inhibidores de proteasas; PMSF 1 mM, aprotinina 2 μ M, leupeptina y pepstatina 1 μ g/ μ l). Luego, a cada extracto proteico se le agregó 10 μ l de proteína A-agarosa y se incubó por 1 hora a 4°C con agitación continua. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3000 xg por 5 minutos y el sobrenadante fue incubado con 5 μ l del anticuerpo anti-D2R policlonal hecho en conejo (sc-9113/H-50; Santa Cruz Biotechnology) a 4°C por toda la noche y bajo agitación continua. Al otro día, se agregó 40 μ l de proteína A-sefarosa a cada extracto proteico y se incubó por 2 horas a 4°C con agitación continua. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 3000 xg por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado. El sedimento obtenido fue lavado 4 veces con 500 μ l de tampón Ripa y centrifugado a 3000 xg por 5 minutos a 4°C. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 40 μ l de tampón muestra 5X (SDS 5%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,05%, 50 mM DTT y Tris-HCl 0,125 M pH 6,8), separado por electroforesis como se describe en la sección 3.2.14 y transferido a membranas de PVDF como se describe en la sección 3.2.15. La detección inmunológica de las proteínas inmunoprecipitadas se realizó utilizando el anticuerpo anti-D2R monoclonal hecho en ratón (sc-5303/B-10; Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:1000, como se describe en la sección 3.2.16.

3.2.18 Determinación de viabilidad en espermatozoides

La viabilidad de los espermatozoides fue determinada a través del método de eosina-negrosina. Este método se basa en que las células viables tienen su membrana celular intacta, por lo tanto, no permiten el ingreso a la célula de colorantes como la eosina quedando la célula sin teñir. Por otro lado, los espermatozoides no viables pierden su integridad de membrana permitiendo el ingreso de la eosina al interior de la célula, la cual quedará teñida de un color rosado (**Figura 3**). La negrosina no es capaz de ingresar a las células vivas o muertas y sólo es utilizado como un medio de contraste para visualizar mejor a las células no teñidas (células viables). El método se realiza mezclando 50 μ l de una suspensión de espermatozoides con 50 μ l de una mezcla de eosina-negrosina (1 parte de eosina + 2 partes de negrosina) la cual se incuba por 30 segundos. Luego se toma una alícuota de aproximadamente 10 μ l y se deposita sobre un extremo de un porta objeto limpio, con la ayuda del extremo de otro porta objeto se extiende la gota a lo largo de toda la superficie del porta objeto generando un delgado frotis el cual se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se analiza la muestra contando en el microscopio óptico (objetivo de 100X) 200 espermatozoides, con los cuales se calcula el % de espermatozoides viables. Por cada tratamiento se calculó tres veces el % de viabilidad obteniéndose un promedio y una desviación estándar, las cuales fueron graficadas utilizando el programa Sigma Plot 8.0.



Figura 3: Determinación de la viabilidad espermática: La viabilidad fue determinada por el método de eosina-negrosina. Esta técnica permite diferenciar a los espermatozoides viables (**A**), de los no viables (**B**), debido a que estos últimos han perdido su integridad de membrana permitiendo el ingreso de la eosina al interior de la célula tiñéndose de color rosado. El porcentaje de viabilidad se calcula después de contar 200 espermatozoides (barra=10 μ m).

3.2.19 Estudio funcional del receptor de dopamina D2 en espermatozoides

Para realizar los estudios funcionales del receptor D2 se utilizaron espermatozoides de bovino debido a la cantidad y calidad de espermatozoides presentes en los eyaculados obtenidos del Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile.

3.2.19.1 Efecto de dopamina en la fosforilación de proteínas

Eyaculados frescos de bovinos obtenidos del Centro de Inseminación Artificial fueron lavados 4 veces con medio nutritivo Ham's F-12 (glucosa 10 mM, piruvato de sodio 1 mM) y recuperados por centrifugación a 600 $\times g$ a temperatura ambiente. Después de corroborar la motilidad y viabilidad espermática, estos fueron incubados con diferentes concentraciones de dopamina (0,1 μM , 1 μM , 10 μM) por 30 minutos y luego procesados para inmunocitoquímica fluorescente como se describe en la sección 3.2.11.

En el caso de análisis por Western blot de proteínas fosforiladas, los espermatozoides fueron incubados con dopamina en medio Ham's F-12 por diferentes tiempos a temperatura ambiente y posteriormente las proteínas totales fueron extraídas como se describe en la sección 3.2.13 y detectadas inmunológicamente como se describe en la sección 3.2.16.

Las bandas obtenidas en los experimentos de Western blot contra la proteína Akt fosforilada fueron analizadas densitométricamente por el programa UN-SCAN-IT gel Versión 4.1, normalizadas con la proteína β -tubulina y los datos fueron graficados con el programa Sigma Plot 8.0.

3.2.19.2 Efecto de dopamina en la viabilidad celular

Eyaculados frescos de bovinos obtenidos del Centro de Inseminación Artificial fueron lavados 4 veces con medio nutritivo Ham's F-12 (glucosa 10 mM, piruvato de sodio 1 mM) y recuperados por centrifugación a 600 xg a temperatura ambiente. Después de corroborar la motilidad y viabilidad espermática, éstos fueron incubados con diferentes concentraciones de dopamina (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) y se realizó la determinación de viabilidad después de 30 minutos y 1 hora de incubación como se describe en la sección 3.2.18.

Para estudiar el efecto protector de dopamina frente a un agente tóxico generador de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno, los espermatozoides de bovino fueron incubados a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de dopamina (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) y GM-CSF 10 nM (control positivo) por 30 minutos. Posteriormente se agregó al medio de incubación peróxido de hidrógeno a una concentración final de 10 mM. Luego, se realizó la determinación de viabilidad espermática después de 30 minutos y 1 hora de incubación con el peróxido de hidrógeno. La viabilidad fue determinada como describe en la sección 3.2.18.

3.2.19.3 Efecto de dopamina en el transporte de 3-O-metilglucosa (3-OMG)

Eyaculados frescos de bovino obtenidos del Centro de Inseminación Artificial fueron lavados 4 veces con tampón de incubación (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM y HEPES 15 mM pH 7,4) y recuperados por centrifugación a 600 xg a temperatura ambiente. Después del último lavado fueron resuspendidos en un pequeño volumen y una alícuota de 10 μ l fue cuantificada en cámara de Neubauer. Una

vez cuantificada la muestra se ajustó a una concentración final de 5×10^8 espermatozoides por ml en tampón de incubación y luego se incubaron en un baño termorregulado a 37°C con diferentes concentraciones de dopamina ($0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$).

Para el estudio del transporte de glucosa se utilizó el análogo no metabolizable de glucosa 3-OMG, que es un sustrato específico de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) y es transportado a favor de un gradiente de concentración hasta que las concentraciones intracelulares y extracelulares son igualadas. Este análogo de glucosa no es fosforilado por enzimas intracelulares, por lo tanto, cualquier cambio en la cantidad del análogo de glucosa presente dentro de la célula, solamente puede ser atribuido a los cambios en el transporte de glucosa dependiente de los transportadores (GLUTs).

El ensayo de transporte se realizó en cámara fría a 4°C y se midió después de 30 minutos y 1 hora de incubación con dopamina. Para cada ensayo de transporte, se mezclaron $250 \mu\text{l}$ de la suspensión de espermatozoides con $50 \mu\text{l}$ de una premezcla que contenía 3-O-metilglucosa (concentración final $0,5 \text{ mM}$) y $1 \mu\text{Ci}$ de 3-O-[metil ^3H]-D-glucosa (A.E. $86,70 \text{ Ci/mmol}$; New England Nuclear [NEN] Du Pont, Wilmington, D.E.), dando un volumen de mezcla total por transporte de $300 \mu\text{l}$. La mezcla se incubó por 15 segundos con agitación continua y la reacción fue detenida con solución de "stop frío" (tampón de incubación + HgCl_2 $0,2 \text{ mM}$) seguida de una centrifugación rápida a 14000 xg por 10 segundos para juntar los espermatozoides en el fondo del tubo y aspirar rápidamente el sobrenadante utilizando una bomba de vacío, el lavado fue repetido por 3 veces. Después del último lavado, se eliminó completamente el sobrenadante y los

espermatozoides fueron resuspendidos en 350 μ l de tampón lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 0,2 %, pH 8,0) e incubados toda la noche a temperatura ambiente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Al otro día, la mezcla fue centrifugada a 14000 xg por 20 minutos y se sacaron 300 μ l del sobrenadante a los que se les agregó 3 ml de mezcla de centelleo. La radiactividad incorporada fue medida por espectroscopía de centelleo líquida y el resultado final expresado como porcentaje del control. Todos los datos fueron graficados utilizando el programa Sigma Plot 8.0.

3.2.20 Análisis estadísticos

En todos los ensayos sometidos a un análisis estadístico se utilizó de 1 eyaculado o una mezcla de eyaculados, que luego fueron separados en diferentes grupos y sometidos a los distintos tratamientos (cada grupo proviene de una población con una misma media). Para comprobar si existían diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos, se realizó una análisis de varianza entre los grupos tratados con diferentes agonistas utilizando el programa computacional GraphPad Prism 4.0, con el cual se sometieron los datos a un análisis de ANOVA de una vía, seguido de un análisis de Bonferroni (que compara entre grupos), aceptando significancia estadística cuando la probabilidad de rechazar a dos grupos distintos fuera menor de 0,05 ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Expresión del receptor de dopamina tipo D2 en testículo de rata.

4.1.1 Gen del receptor de dopamina tipo D2 y diseño de partidores

El gen que codifica el receptor D2 en la rata se encuentra localizado sobre el cromosoma 11 y está compuesto por 8 exones. A través de mecanismos de procesamiento alternativo hay una pérdida del exón 6 (87 pb) que produce la formación de dos isoformas, la corta (D2S) y la larga (D2L). Para estudiar la expresión de ambas isoformas se utilizaron los partidores descritos anteriormente por Wang y col., (2000). Estos partidores, permiten diferenciar claramente entre ambas isoformas (**figura 4**).

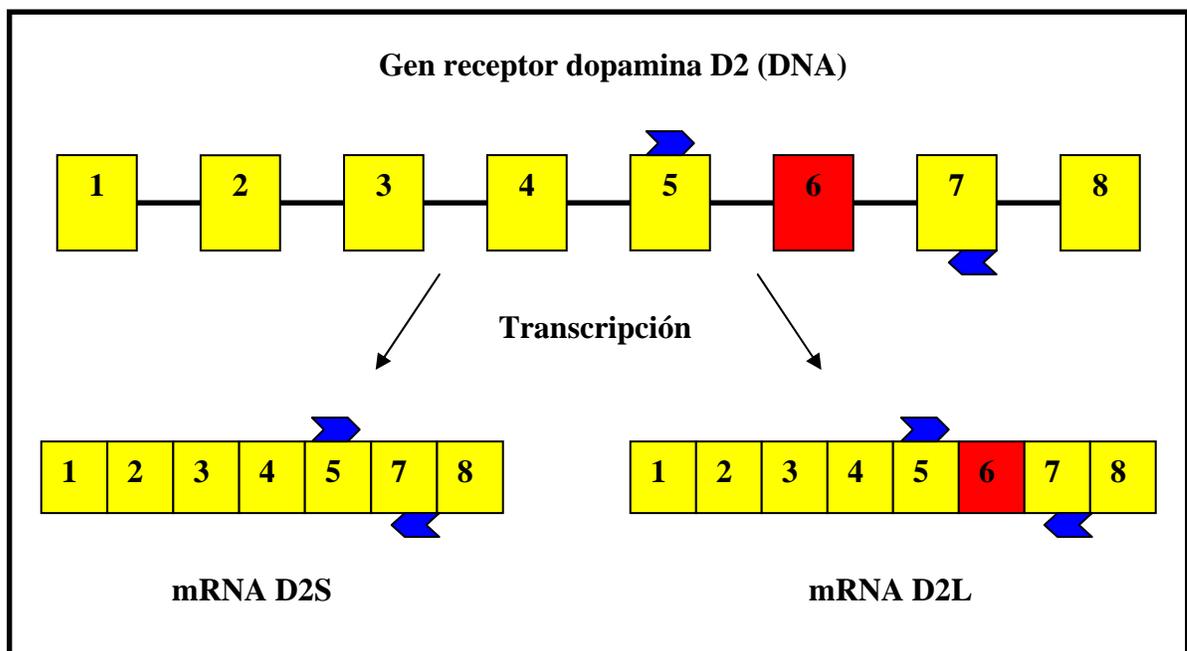


Figura 4: Esquema del gen del receptor de dopamina D2 y diseño de partidores:

En el esquema superior se muestra el gen del receptor compuesto de 8 exones. Las 2 isoformas D2S y D2L se generan por procesamiento alternativo del exón 6 (color rojo). Los partidores utilizados (color azul) permiten diferenciar entre ambas isoformas.

4.1.2 Obtención de RNA total de testículo de rata

Con el objetivo de determinar la correcta integridad del RNA total de testículo de rata para la posterior síntesis del cDNA, se realizó una electroforesis en agarosa/formaldehído. Para controlar la amplificación de los productos de PCR se utilizó como control positivo RNA total de cerebro de rata y RNA total de neuronas corticales de rata en donde el receptor D2 se expresa normalmente. El RNA fue extraído y procesado como se describe en la sección 3.2.3 y 3.2.4. Como se muestra en la **figura 5** se obtuvieron 2 bandas correspondientes al RNA ribosomal 18S y 28S.

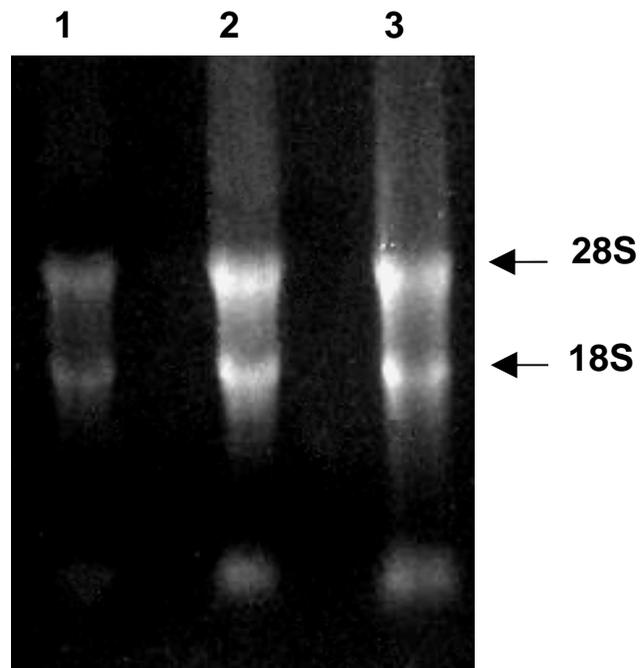


Figura 5: Electroforesis de RNA de diferentes tejidos de rata: Gel de agarosa al 1,5% conteniendo formaldehído. En cada pocillo se cargaron aproximadamente 20 μg de RNA. 1) Neuronas corticales de rata, 2) cerebro de rata 3) testículo de rata. Las flechas indican el RNA ribosomal 18S y 28S.

4.1.3 Amplificación por RT-PCR del receptor D2 en testículo de rata

Para la reacción de RT-PCR se utilizó RNA total de cultivo primario de neuronas corticales, cerebro y testículo de rata, obtenidos como se describe en la sección 3.2.3. La utilización de neuronas corticales y tejido cerebral es ampliamente aceptado como control positivo ya que el cerebro corresponde al primer tejido donde el receptor de dopamina D2 fue descrito (Bunzow y col., 1988). Las condiciones utilizadas para síntesis del cDNA (RT) y la amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son descritas en la sección 3.2.5 y 3.2.6, respectivamente.

En la **figura 6** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% de la reacción de PCR utilizando cDNA de neuronas corticales, cerebro y testículo de rata (**carriles 1, 2, 3**, respectivamente) y usando partidores gen específicos del receptor D2, los cuales permiten diferenciar claramente entre ambas isoformas del receptor de acuerdo al tamaño del producto generado. Bajo las condiciones de reacción de amplificación descritas en 3.2.6 se obtuvieron dos bandas, que al ser comparadas con el estándar de peso molecular de 100 pb, tienen un tamaño aproximado de 230 pb para la banda de menor tamaño y 320 pb para la banda de mayor tamaño. El producto de amplificación de mayor tamaño corresponde a la isoforma D2L (valor teórico: 321 pb) y la banda de menor tamaño corresponde a la isoforma D2S (valor teórico: 234 pb). La diferencia de tamaño se produce por la pérdida del exón 6 en la isoforma corta (D2S), generando una diferencia de tamaño de 87 pb (Monsma y col., 1989), la cual se ve claramente en el gel. Se observa además, que la intensidad de las bandas es distinta, obteniéndose un producto de amplificación mayoritario para la isoforma larga (D2L), resultado descrito también por otros autores (Montmayeur y col., 1991).

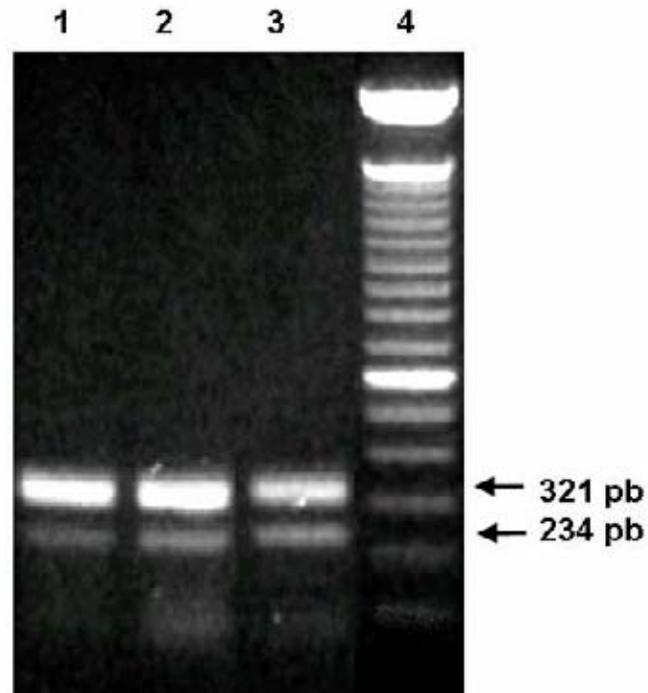


Figura 6: Amplificación por RT-PCR de transcritos del receptor de dopamina D2: Electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TAE 1X y teñido con bromuro de etidio. **1)** Neuronas corticales, **2)** cerebro y **3)** testículo de rata, **4)** estándar de peso molecular de 100 pb. Las flechas indican los tamaños de los productos específicos de amplificación. La isoforma larga (D2L) tiene un tamaño de 321 pb mientras que la isoforma corta (D2S) tiene un tamaño de 234 pb. La diferencia de tamaño entre los productos de amplificación es de 87 pb.

4.2. Inmunolocalización del receptor de dopamina D2 en línea germinal masculina

4.2.1 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de rata adulta y pre-púber.

Para estudiar la inmunolocalización del receptor D2 en un tejido maduro con una continua producción de espermatozoides (adulto) y en un tejido inmaduro sin producción de espermatozoides (pre-púber), se utilizaron cortes de testículo de una rata adulta de 60 días y testículos de una rata de 6 días de edad. Los cortes de testículo fueron proporcionados por el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile y se realizó la inmunolocalización según lo descrito en la sección 3.2.7.

La **figura 7** muestra la inmunolocalización del receptor D2 en túbulos seminíferos de una rata pre-púber de 6 días de edad. La marca positiva de la detección del receptor D2 es de color café (indicada con flechas) y solamente se presentó sobre los gonocitos (células que posteriormente darán origen a la línea germinal masculina). La señal generada por el receptor D2 sobre estas células, muestra una posible localización citoplasmática y de membrana, la cual no se observa en los controles negativos.

En la **figura 8** se observa la inmunolocalización del receptor D2 en túbulos seminíferos de testículo adulto. La inmunorreacción positiva puede observarse a lo largo de toda la línea germinal masculina, sin embargo las células de menor estado de diferenciación (espermatogonias) presentan una señal más intensa comparada con las otras células germinales del túbulo (espermatoцитos y espermátidas). La señal producida en las espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas al igual que los gonocitos pre-púberes, indican que el receptor D2 es expresado en la línea germinal del testículo de rata. Además, se sugiere que podría haber una expresión diferencial del receptor D2, de acuerdo al grado de diferenciación de las células germinales en el testículo adulto.

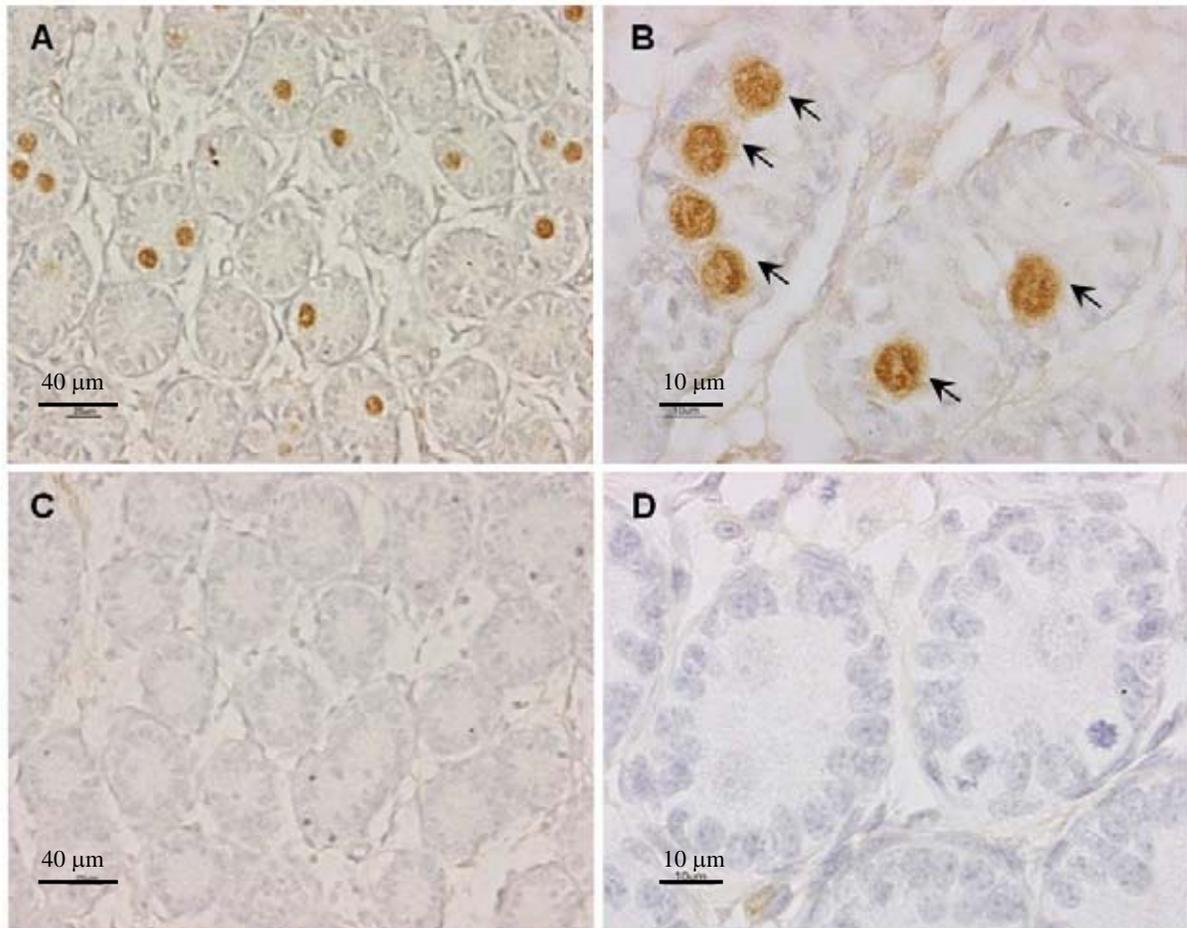


Figura 7: Inmunodetección del receptor D2 en túbulos seminíferos de rata pre-púber: Los cortes de testículo de una rata de 6 días de edad fueron fijados a portaobjetos e incubados con el anticuerpo anti-D2R policlonal. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando el sistema de amplificación biotina/estreptavidina-peroxidasa, y revelado con DAB (Quick Staining kit de DAKO). **A)** y **B)** detección del receptor D2 con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). **C)** y **D)** control negativo sin primer anticuerpo. Todas las muestras fueron teñidas con hematoxilina. Las flechas indican reacción positiva del receptor D2 en gonocitos.

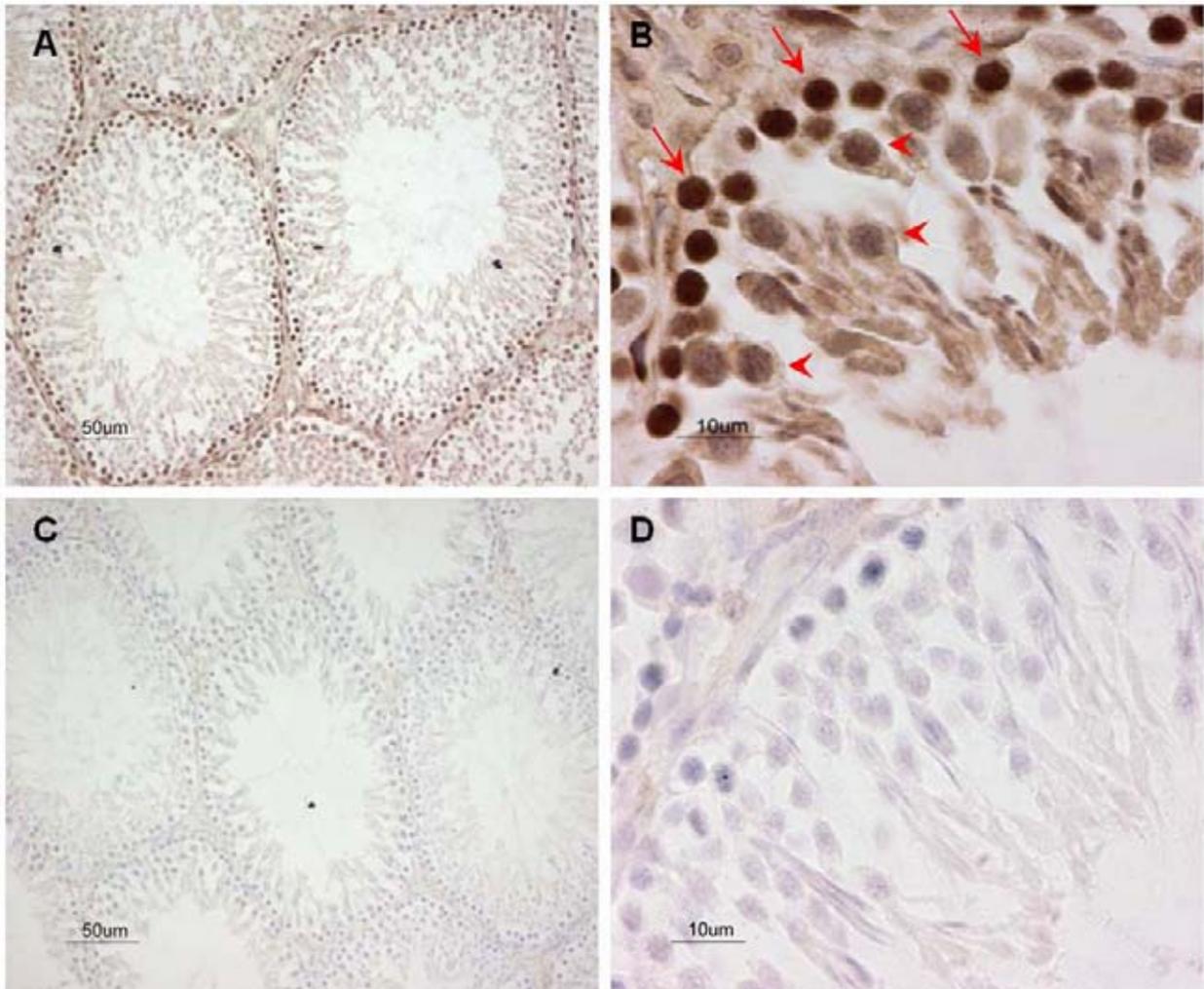


Figura 8: Inmunodetección del receptor D2 en túbulos seminíferos de rata adulta: Los cortes de testículo adulto fueron fijados a portaobjetos e incubados con el anticuerpo anti-D2R policlonal. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando el sistema de amplificación biotina/estreptavidina-peroxidasa, y revelado con DAB (Quick Staining kit de DAKO). **A) y B)** detección del receptor D2 con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). **C) y D)** control negativo sin primer anticuerpo. Todas las muestras fueron teñidas con hematoxilina. Las flechas indican reacción positiva del receptor D2 en espermatogonias (flechas) y espermatocitos (puntas de flechas).

4.2.2 Inmunocitoquímica en espermatoцитos y espermátidas de testículo de rata.

Como se observa en la **figura 8, panel B**, la detección del receptor D2 arrojó una fuerte reacción positiva a lo largo de toda la línea germinal masculina del testículo de rata adulta. Debido a que el túbulo seminífero está formado por un componente somático (células de Sertoli) y uno germinal (espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides), se hace necesario establecer el patrón de localización del receptor D2 en células aisladas. Para esto, se utilizó el método de separación en gradiente de BSA (1,5-3,5%) que se describe en la sección 3.2.8 y que permite obtener espermatoцитos y espermátidas aisladas. Las células así obtenidas fueron fijadas, esparcidas sobre portaobjetos y posteriormente sometidas a la inmunolocalización como se describe en la sección 3.2.9.

En la **figura 9** se observa el resultado obtenido para la inmunocitoquímica realizada en espermatoцитos y espermátidas de rata. El **panel A y C** corresponden a la detección del receptor D2 utilizando un anticuerpo policlonal, observándose inmunorreactividad positiva de color café (indicado con flechas) en espermatoцитos y espermátidas. La señal total generada aparentemente podría estar compuesta por señales parciales provenientes de la membrana plasmática y el citoplasma. Además, la señal observada sobre espermatoцитos fue de una mayor intensidad que la producida sobre las espermátidas, sugiriendo que podría existir una cantidad diferencial de receptor entre estos dos tipos celulares. En los **paneles B y D** se observan los controles negativos sin primer anticuerpo, donde no se observó inmunorreactividad.

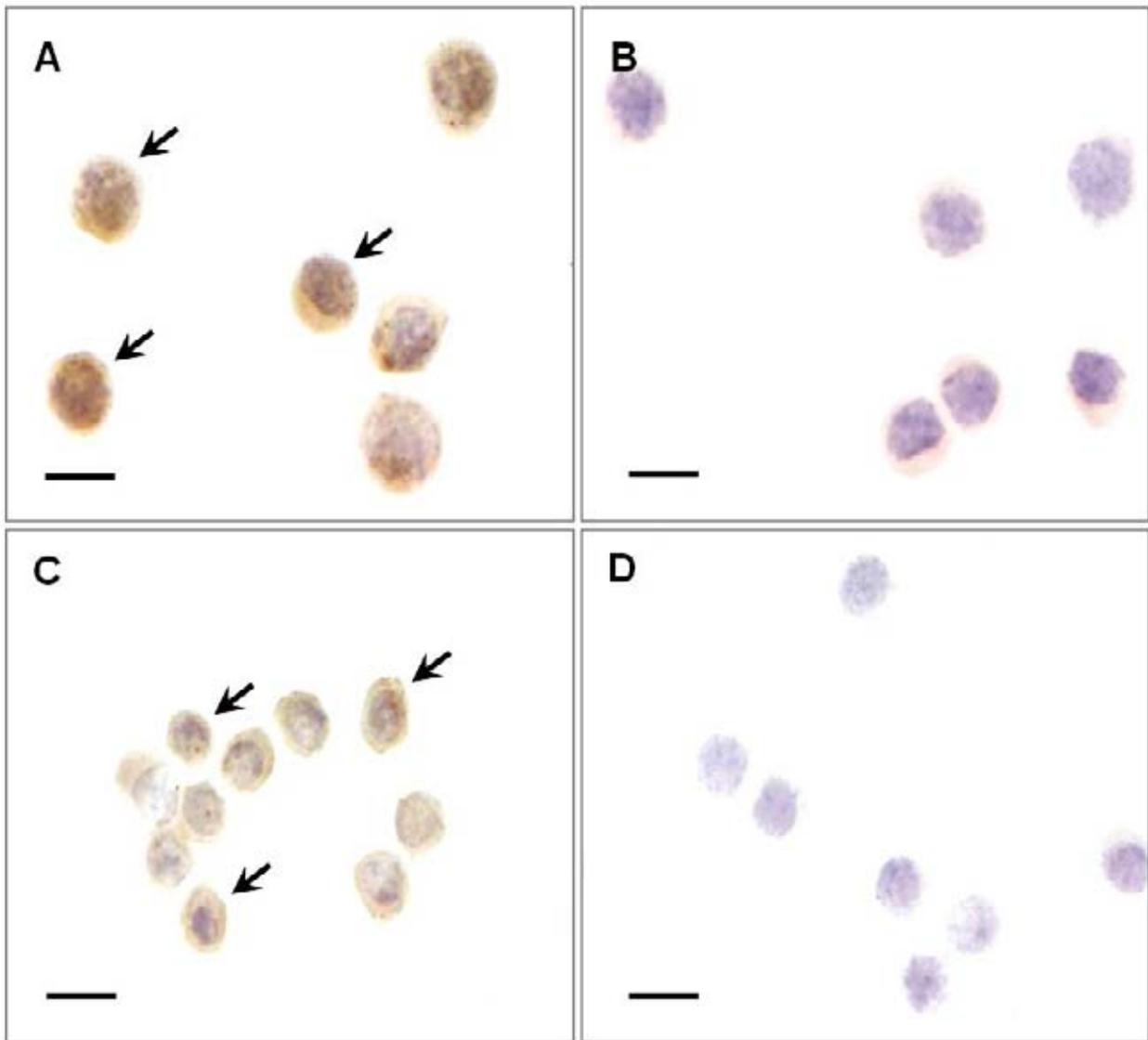


Figura 9: Inmunodetección del receptor D2 en células germinales aisladas de rata:

Células aisladas fueron obtenidas por separación en gradiente de BSA (1,5-3,5%), esparcidas en porta objetos e incubadas con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando el sistema de amplificación biotina/estreptavidina-peroxidasa y revelado con DAB (Quick Staining kit de DAKO). **A) y B)** espermatocitos, **C) y D)** Espermátidas. **B) y D)** control negativo sin primer anticuerpo. Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina. Las flechas indican reacción positiva (barra= 10 μ m).

4.2.3 Inmunofluorescencia del receptor D2 sobre espermatozoides de rata, bovino y humano.

Para realizar la inmunodetección del receptor D2 sobre espermatozoides, se utilizaron muestras provenientes de epidídimo de rata adulta y eyaculados frescos de toro y humano. Los espermatozoides obtenidos fueron lavados, fijados, y esparcidos sobre porta objetos como se describe en la sección 3.2.10 y posteriormente sometidos a la inmunolocalización como se describe en la sección 3.2.11. Para controlar la detección del receptor D2, se utilizaron neuronas corticales de cerebro de rata.

En la **figura 10, panel A**, se muestra la detección del receptor D2 sobre espermatozoides de rata. La inmunorreacción positiva es de color verde y la marca se presentó en la pieza media, pieza principal y región acrosomal del espermatozoide. La señal de la región acrosomal presenta un patrón puntiforme y está localizada sobre la cabeza del espermatozoide (**panel A'**). En el **panel C** se muestra la detección D2 en neuronas (control positivo) la que generó una fuerte señal principalmente localizada en el citoplasma.

En la **figura 11** se muestra la detección del receptor D2 sobre espermatozoides de bovino y humanos. En el **panel A** se muestra la inmunorreacción positiva sobre espermatozoides de toro y al igual que los espermatozoides de rata, la señal positiva se presentó en la pieza media, pieza principal y región acrosomal. La señal de la región acrosomal presentó un patrón puntiforme, pero con la diferencia que el acrosoma en el bovino se encuentra localizado en un extremo de la cabeza del espermatozoide. En el **panel C** se muestra la inmunorreacción positiva sobre espermatozoides humanos y que a diferencia de lo observado en rata y toro, la señal sólo se presentó en la pieza media y estuvo ausente en la región acrosomal (**panel C'**).

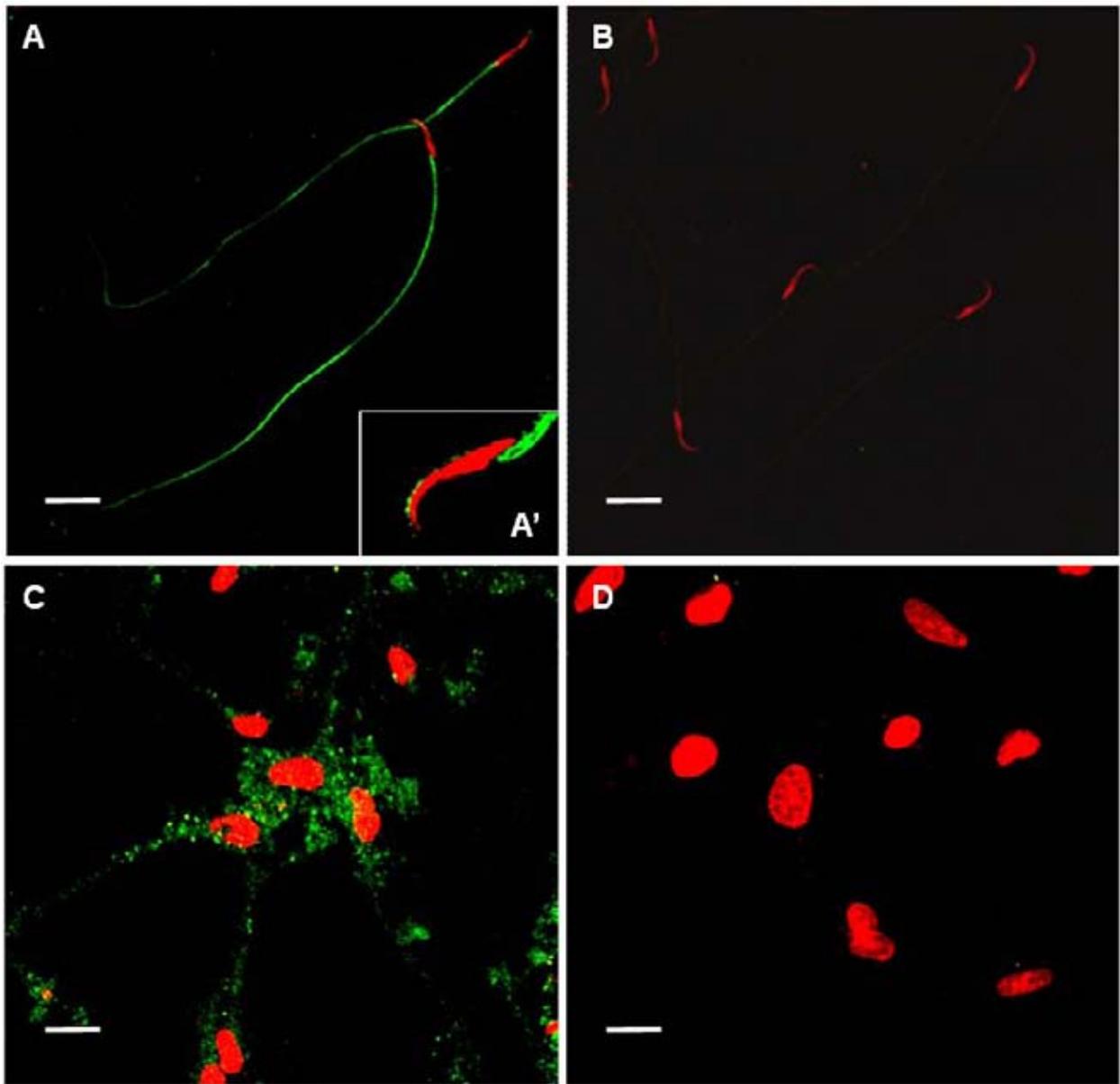


Figura 10: Inmunodetección fluorescente del receptor D2 en espermatozoides de rata: **A)** Espermatozoides de epidídimo de rata incubados con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). **A')** Amplificación de la cabeza del espermatozoide de rata. **B)** Espermatozoide de epidídimo de rata (control negativo). **C)** Neuronas corticales de rata incubadas con anticuerpo policlonal anti-D2R (1:50; control positivo). **D)** Neuronas corticales de rata (control negativo). La detección del receptor D2 fue realizada usando el anticuerpo secundario-Alexa fluor 488 (marca de color verde). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (marca de color rojo), (barra= 10 μ m).

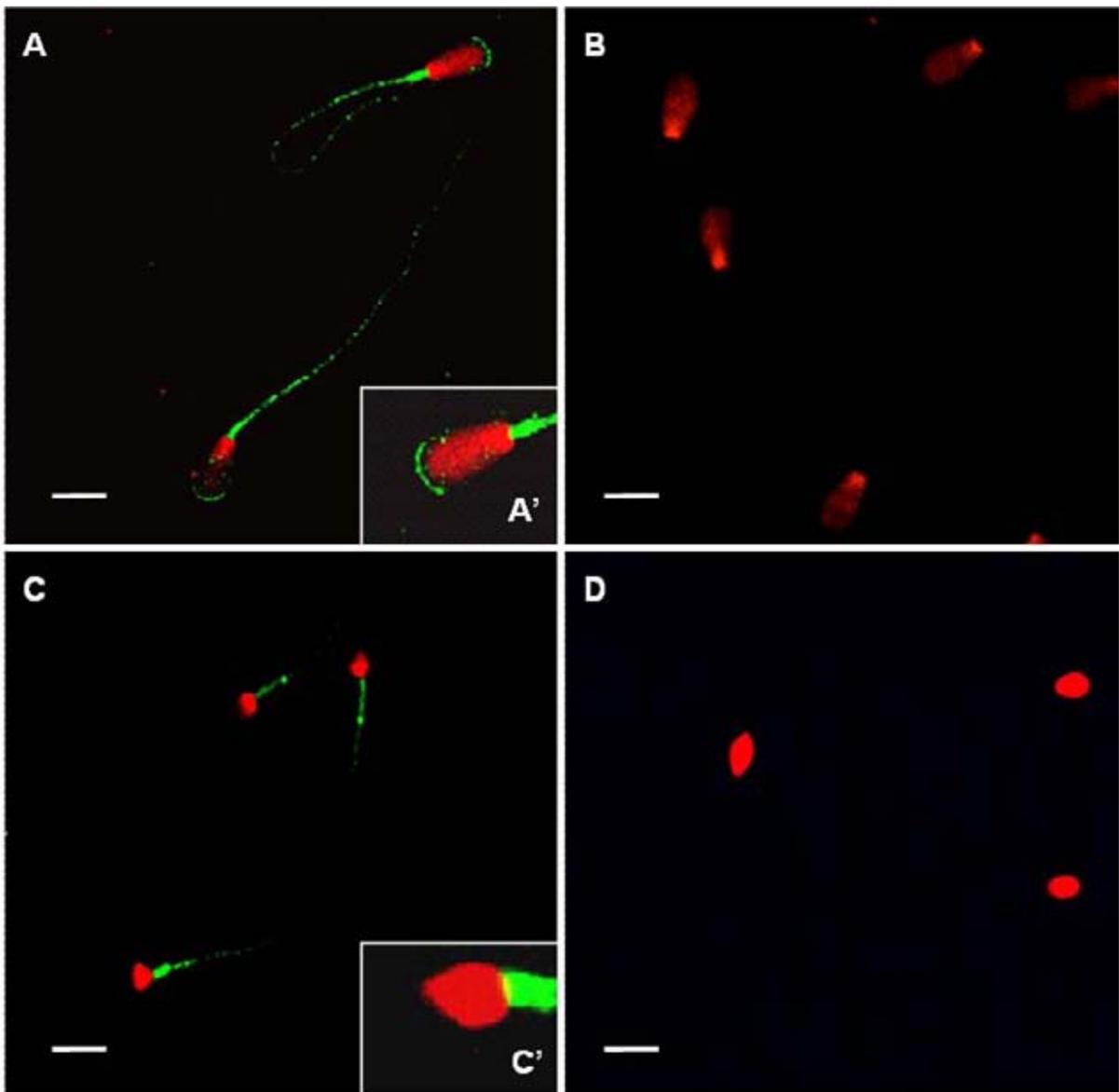


Figura 11: Inmunodetección fluorescente del receptor D2 en espermatozoides de toro y humano: **A)** Espermatozoides frescos de toro incubados con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). **A')** Amplificación de la cabeza del espermatozoide de toro. **B)** Espermatozoides frescos de toro (control negativo). **C)** Espermatozoides frescos humanos incubados con anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:50). **C')** Amplificación de la cabeza del espermatozoide humano. **D)** Espermatozoides frescos humanos (control negativo). La detección del receptor D2 fue realizada usando el anticuerpo secundario-Alexa fluor 488 (marca de color verde). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (marca de color rojo), (barra = 10 μm).

4.3 Inmunodetección del receptor D2 en extractos proteicos de rata.

Con el objetivo de determinar la presencia del receptor en la línea germinal masculina de rata y además corroborar el peso molecular descrito para el receptor en la literatura, se realizó la inmunodetección en extractos de proteínas totales de cerebro, neuronas, testículo y espermatozoides de rata. La extracción de proteínas fue realizada como se describe en la sección 3.2.13. Posteriormente, los extractos proteicos fueron cuantificados por el método de Bradford y luego separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% como se describe en la sección 3.2.14. Finalizada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF como se describe en la sección 3.2.15. Las membranas transferidas fueron posteriormente procesadas para la detección inmunológica del receptor D2 utilizando un anticuerpo policlonal anti-D2R (dilución 1:1000) como se describe en la sección 3.2.16.

Como se observa en la **figura 12, panel A**, el receptor presentó inmunorreacción positiva en cerebro (**carril 1**) y neuronas (**carril 2**) usadas como control positivo y también en testículo (**carril 3**) y espermatozoides (**carril 4**) de rata. La banda que migra aproximadamente a 50 kDa, corresponde al tamaño esperado para el monómero del receptor (Mosma y col., 1989). Las bandas de mayor tamaño (sobre 50 kDa) pueden corresponder a glicosilaciones (Clagett y col., 1989), dimerización (Zawarynski y col., 1998) y heterodimerización (Canals y col., 2003) descritas para este receptor y que se observan claramente en los **carriles 1, 3 y 4**. La señal generada bajo los 50 kDa en los carriles 3 y 4 puede corresponder a epítopes del receptor de menor tamaño producidas por degradación parcial de la muestra.

4.3.1 Inmunoprecipitación del receptor D2 de extractos proteicos de rata, humano y bovino.

Debido a la heterogeneidad mostrada por el receptor D2 en el análisis de Western blot directo (**figura 12, panel A**), se decidió realizar una inmunoprecipitación del receptor D2 con el objetivo de obtener un resultado más limpio. La extracción de proteínas y posterior cuantificación fue realizada como se describe en la sección 3.2.13. Luego, 500 μg de proteínas totales fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-D2R hecho en conejo y posteriormente el complejo antígeno-anticuerpo fue purificado por afinidad a través de un complejo comercial de proteína-A unido a sefarosa, como se describe en la sección 3.2.17. El complejo final obtenido fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, como se describe en la sección 3.2.14, transferido a membranas de PVDF y las proteínas detectadas inmunológicamente con un anticuerpo monoclonal anti-D2R hecho en ratón como se describe en la sección 3.2.16.

En la **figura 12, panel B**, se muestra la reacción positiva del receptor D2 sobre tejido de rata (cerebro, testículo, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides) y espermatozoides frescos de humanos y bovinos. A diferencia del resultado obtenido en la inmunodetección con el anticuerpo policlonal (**figura 12, panel A**), el anticuerpo monoclonal sólo fue capaz de detectar una banda de aproximadamente 50 kDa, que corresponde al tamaño esperado para el monómero del receptor (Mosma y col., 1989). Esto indicaría, que en las condiciones trabajadas, el anticuerpo monoclonal no es capaz de interactuar con los epítopes de mayor tamaño molecular o bien, que la forma monomérica del receptor es más fácilmente inmunoprecipitada por el anticuerpo policlonal, debido a una posible mejor interacción de este anticuerpo con sus epítopes.

4.4 Inmunodetección de PI3K sobre espermatozoides humanos y bovinos

Debido a los antecedentes de la literatura que indicaban que el receptor D2 es capaz de activar la vía PI3K-Akt y producir aumento de la viabilidad celular en líneas celulares y cultivo primario de neuronas (Nair y col., 2003), (Kihara y col., 2002), se hacía indispensable conocer la distribución de la proteína quinasa PI3K en espermatozoides. Para este fin, se utilizaron espermatozoides frescos de humano y bovino los que fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos previamente cubiertos con gelatina y posteriormente sometidos a la detección inmunológica fluorescente como se describe en la sección 3.2.11.

En la **figura 13** se observan los resultados obtenidos para la inmunocitoquímica realizada en espermatozoides humanos y bovinos. Los **paneles A y B** muestran la señal positiva de color verde (ALEXA-488) sobre espermatozoides humanos y se encuentra localizada sobre la pieza principal, pieza media y región acrosomal. Los **paneles C y D** muestran la señal positiva de color verde (ALEXA-488) sobre espermatozoides de bovino y se observa una fuerte señal sobre la región acrosomal, una leve presencia del receptor sobre la pieza media y prácticamente imperceptible en la pieza principal. Estos antecedentes en conjunto, demuestran que la proteína PI3K está presente en espermatozoides humanos y bovinos con una distribución similar.

En el caso del espermatozoide bovino, la presencia de PI3K en la región acrosomal se correlaciona con la presencia del receptor D2 en esta zona, sugiriendo que podría existir una potencial activación de la vía PI3K por el receptor D2 en la región acrosomal de este espermatozoide.

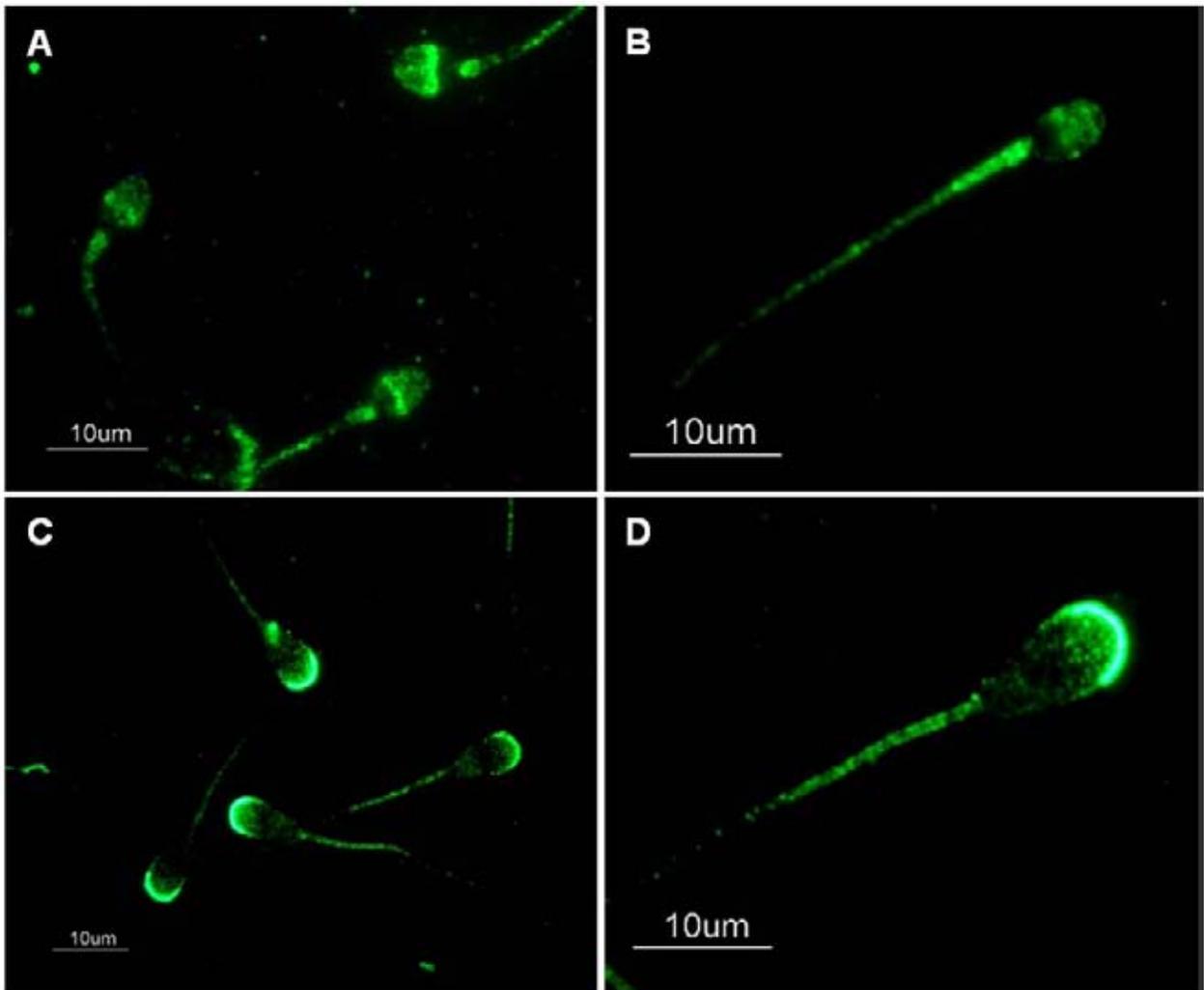


Figura 13: Inmunodetección fluorescente de la proteína PI3K sobre espermatozoides humanos y bovinos: A) y B) espermatozoides humanos. C) y D) espermatozoides bovinos. Espermatozoides frescos de humano y bovino fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos, incubados con anticuerpo policlonal anti-PI3K subunidad p110 β (dilución 1:100) y detectados con segundo anticuerpo unido a ALEXA-488 (color verde). Los controles negativos no mostraron fluorescencia inespecífica (dato no mostrado). Las imágenes fueron obtenidas por microscopia de epifluorescencia.

4.5 Inmunodetección de las proteínas pro-apoptóticas BAD y caspasa-9 sobre espermatozoides humanos y bovinos.

La activación del receptor D2 y posterior activación de la vía PI3K-Akt es capaz de inhibir blancos intracelulares implicados en mecanismos pro-apoptóticos favoreciendo la viabilidad celular (Nair y col., 2003), (Kihara y col., 2002). Dos de las proteínas pro-apoptóticas blancos de la vía PI3K-Akt son BAD y Caspasa-9. Con el objetivo de conocer su distribución subcelular, se utilizaron espermatozoides frescos de humano y bovino obtenidos como se describe en la sección 3.2.10 y sometidos a la detección inmunológica fluorescente como se describe en la sección 3.2.11.

En la **figura 14**, **paneles A y B** se muestra la inmunorreacción positiva de color verde para la proteína BAD sobre espermatozoides humanos, la señal se localizó exclusivamente en la región acrosomal y pieza media. En los **paneles C y D** se muestra la inmunorreacción positiva de color verde para la proteína BAD en espermatozoides bovinos, la señal se localizó en la región acrosomal y con mayor intensidad en la zona media inferior de la cabeza, no observándose señal en la pieza media.

En la **figura 15**, **paneles A y B** se muestra la inmunorreacción positiva de color verde para la proteína Caspasa-9 sobre espermatozoides humanos, la señal se presentó exclusivamente sobre la pieza media (región mitocondrial). Los **paneles C y D** muestran la inmunorreacción positiva de color verde para la proteína Caspasa-9 sobre espermatozoides bovinos, la señal se observó levemente sobre la pieza media y con mayor intensidad en la región acrosomal.

Estos resultados en conjunto demuestran que las proteínas pro-apoptóticas BAD y Caspasa-9 están presentes en espermatozoides humanos y bovinos.

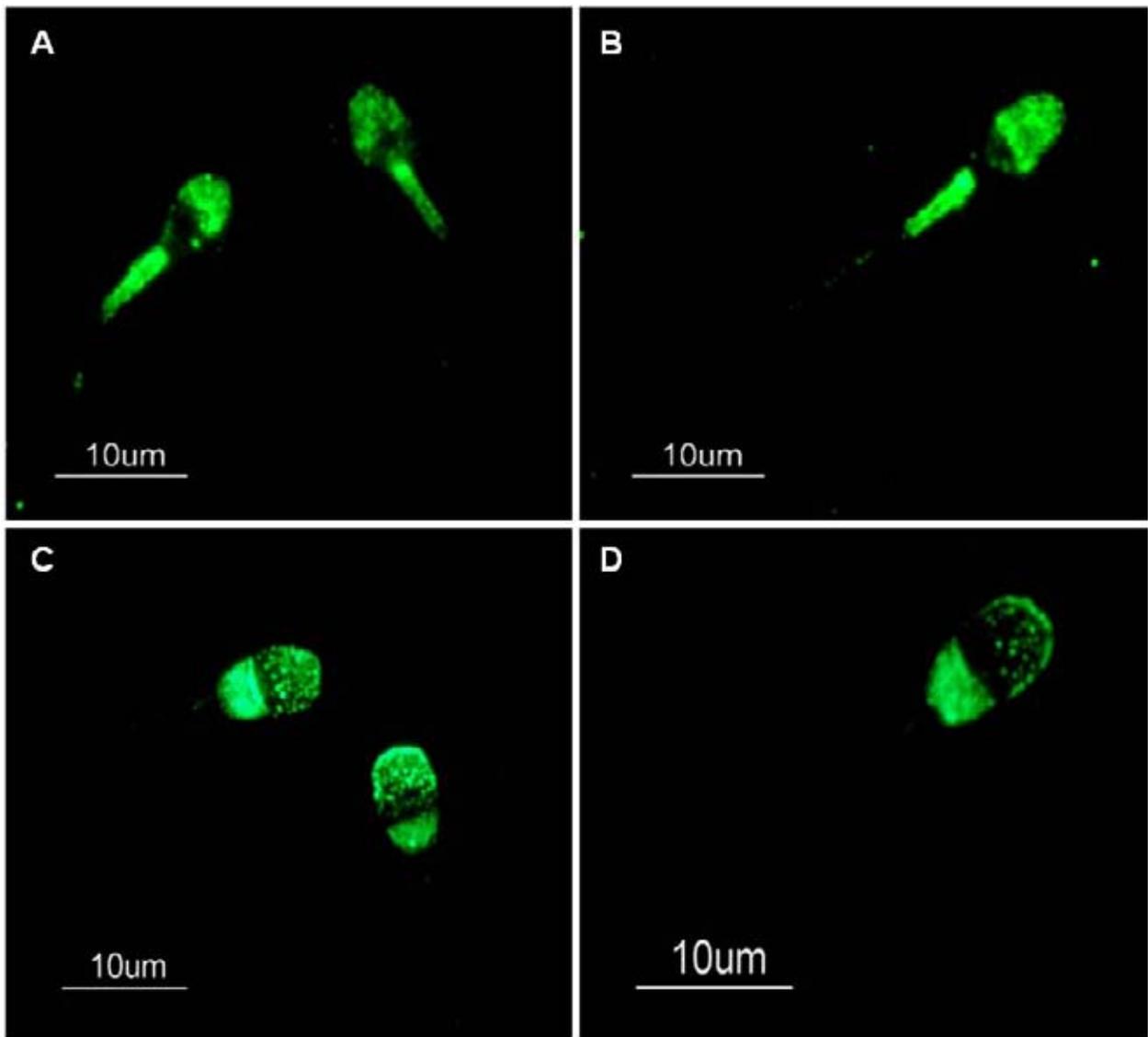


Figura 14: Inmunodetección fluorescente de la proteína BAD sobre espermatozoides humanos y bovinos: A) y B) espermatozoides humanos. C) y D) espermatozoides de bovino. Espermatozoides frescos de humano y bovino fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos, incubados con anticuerpo policlonal anti-BAD total (dilución 1:100) y detectados con segundo anticuerpo unido a ALEXA-488 (color verde). Los controles negativos no mostraron fluorescencia inespecífica (dato no mostrado). Las imágenes fueron obtenidas por microscopia de epifluorescencia.

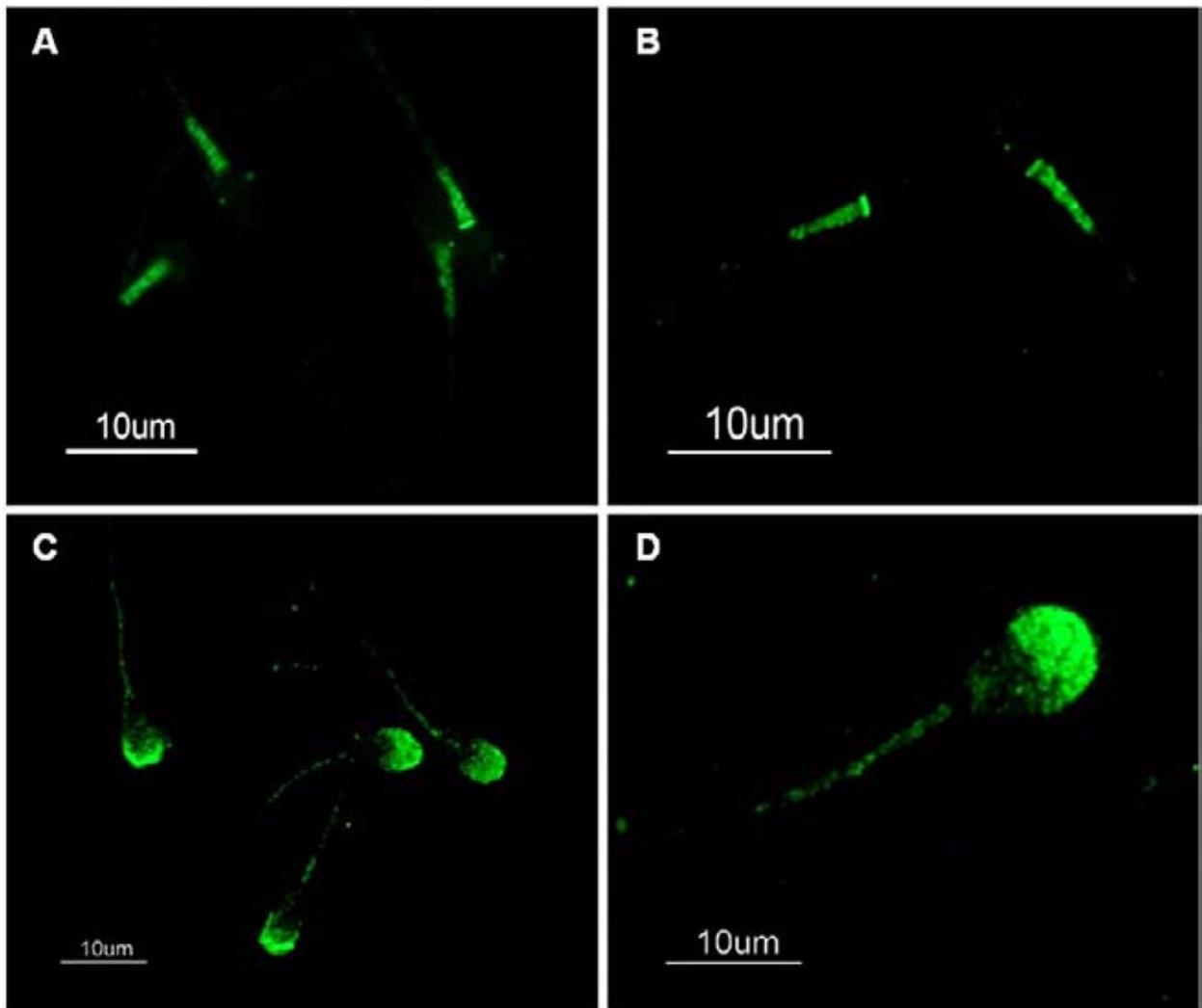


Figura 15: Inmunodetección fluorescente de la proteína Caspasa-9 sobre espermatozoides humanos y bovinos: A) y B) espermatozoides humanos. C) y D) espermatozoides de bovino. Espermatozoides frescos de humano y bovino fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos, incubados con anticuerpo policlonal anti-Caspasa-9 total (dilución 1:100) y detectados con segundo anticuerpo unido a ALEXA-488 (color verde). Los controles negativos no mostraron fluorescencia inespecífica (dato no mostrado). Las imágenes fueron obtenidas por microscopia de epifluorescencia.

4.6 Inmunodetección de la proteína Akt fosforilada sobre espermatozoides frescos de bovino.

La proteína quinasa B o Akt juega un rol crítico en el control del balance entre la viabilidad y la apoptosis (Datta y col., 1999). Generalmente esta proteína es activada por una vía dependiente de PI3K que implica su activación por fosforilación en Thr-308 y Ser-473 (Andjelkovic y col., 1997). Una vez activada, su función es promover la viabilidad celular inhibiendo la apoptosis a través de su habilidad de fosforilar e inactivar a proteínas pro-apoptóticas como BAD y Caspasa-9 (Vivanco y col., 2002). Con el objetivo de conocer la distribución subcelular y el estado de fosforilación de Akt en espermatozoides frescos, se utilizaron eyaculados frescos de toro los que fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos previamente cubiertos con gelatina y posteriormente sometidos a la detección inmunológica fluorescente como se describe en la sección 3.2.11.

En la **figura 16, paneles A y B**, se muestra la inmunorreacción positiva de color café de p-Akt en Thr-308, la señal se localizó principalmente en la región acrosomal y pieza media del espermatozoide. Además, una señal de menor intensidad fue observada en la zona media de la cabeza (región ecuatorial). En los **paneles C y D** se muestra la inmunorreacción positiva de color café para p-Akt en Ser-473, la señal se localizó exclusivamente sobre la pieza media del espermatozoide (región mitocondrial). Estos resultados sugieren que podrían existir dos poblaciones de la proteína Akt fosforilada en espermatozoides frescos de toro, una localizada en la región acrosomal y fosforilada sólo en Thr-308 y la otra población localizada sobre la pieza media del espermatozoide y posiblemente fosforilada simultáneamente en Thr-308 y Ser-473.

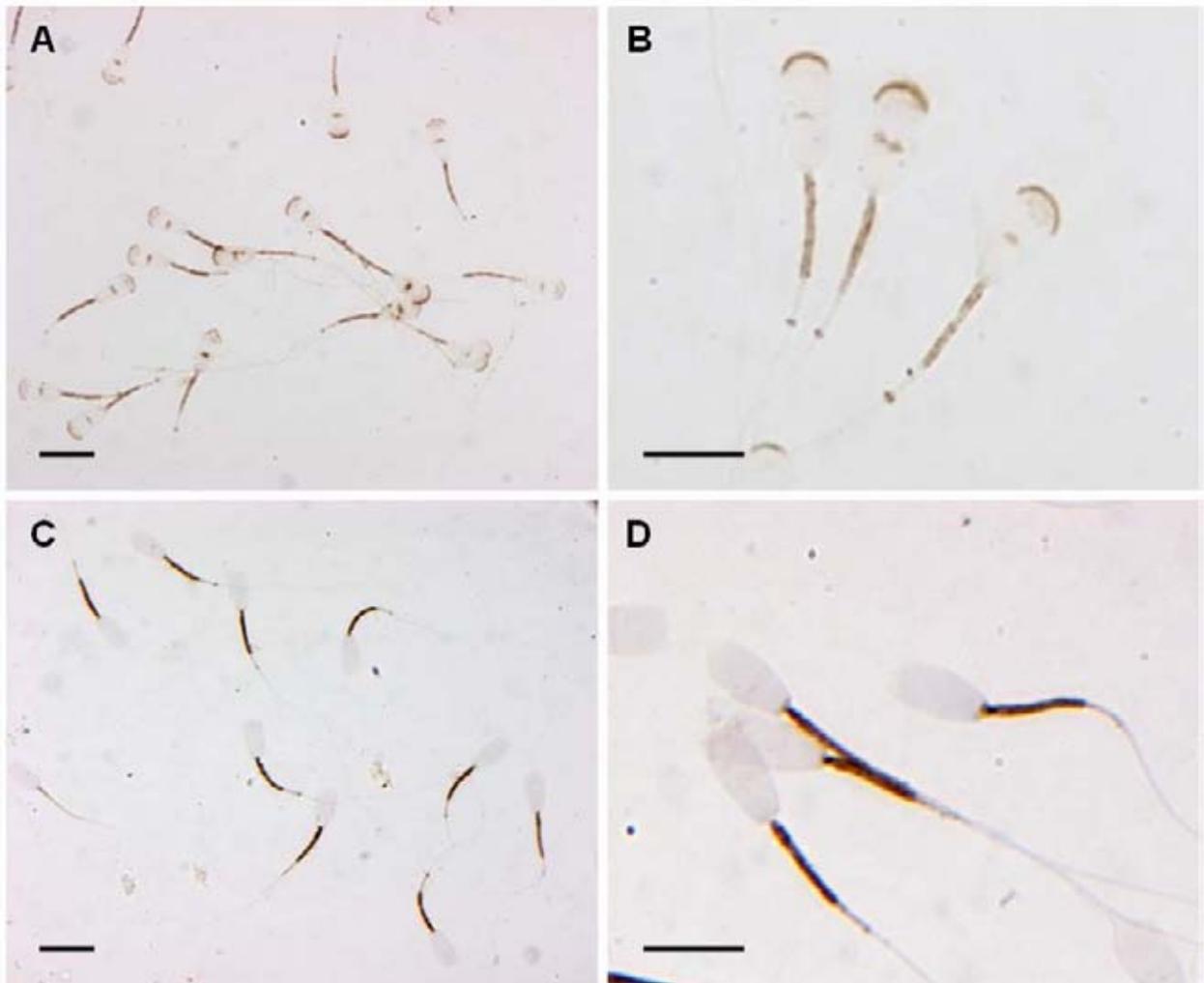


Figura 16: Inmunodetección de la proteína Akt fosforilada sobre espermatozoides frescos de bovino: A) y B) Detección de p-Akt en Thr-308 (dilución 1:50). C) y D) Detección de p-Akt en Ser-473 (dilución 1:50). Espermatozoides frescos de toro fueron lavados, fijados y esparcidos sobre porta objetos, incubados con los respectivos anticuerpos, el complejo antígeno-anticuerpo detectado usando el sistema de amplificación biotina/estreptavidina-peroxidasa y revelado con DAB (Quick Staining kit de DAKO). **(A) y C)** aumento 50X; **(B) y D)** aumento 250 X). Los controles negativos no mostraron marca inespecífica (dato no mostrado). (barra = 10 μ m).

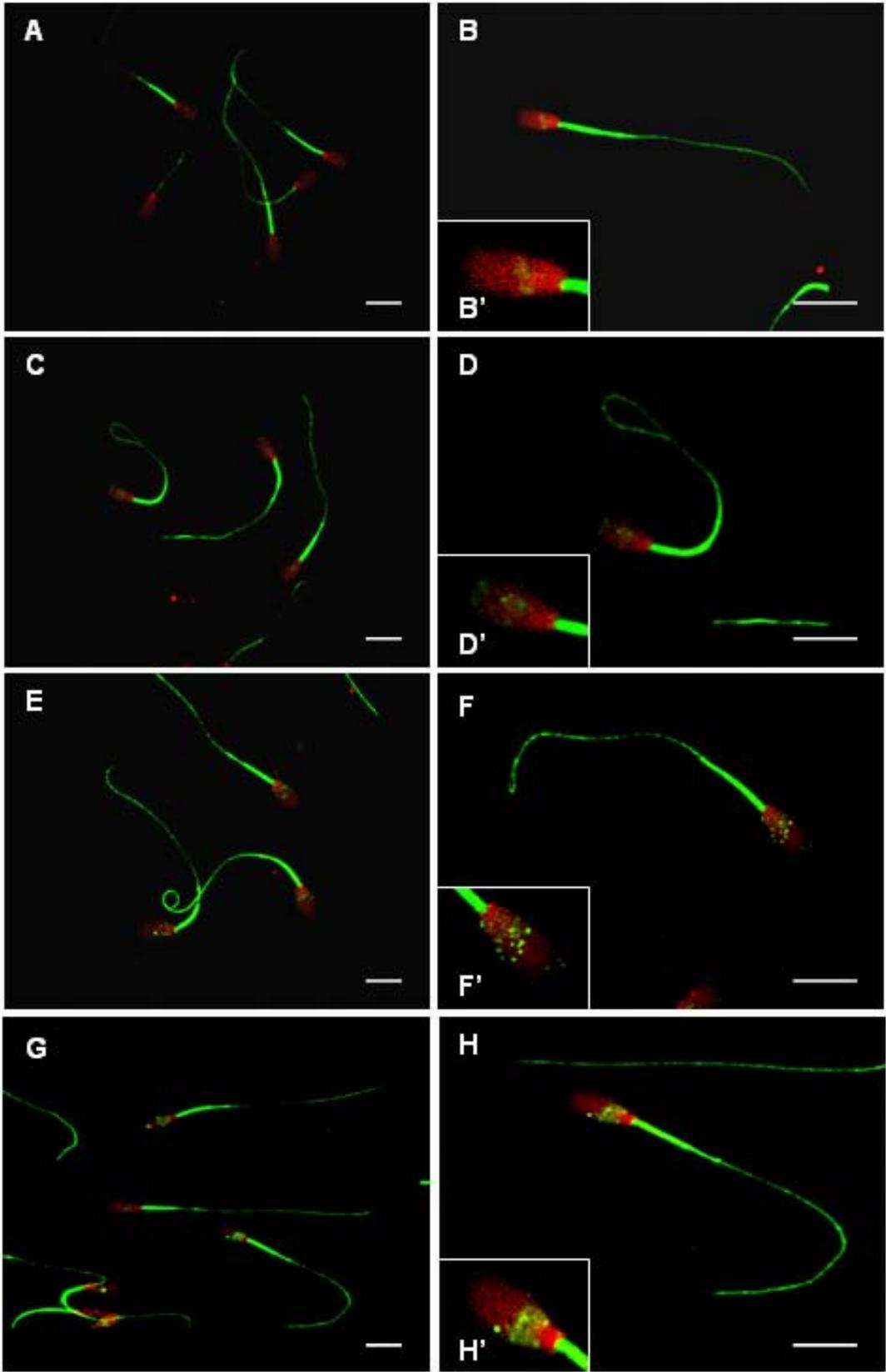
4.7 Efecto de dopamina sobre la distribución subcelular de p-Akt (Ser-473) en espermatozoides de bovino.

Con el objetivo de conocer si la activación del receptor D2 por dopamina podría tener algún efecto sobre la distribución subcelular de p-Akt en Ser-473, espermatozoides frescos de bovino fueron lavados e incubados por 30 minutos con diferentes concentraciones de dopamina. Luego fueron fijados, esparcidos sobre porta objetos previamente tratados con gelatina y posteriormente sometidos a la detección inmunológica fluorescente como se describe en la sección 3.2.11.

En la **figura 17** se muestra la localización subcelular de p-Akt en Ser-473 en diferentes tratamientos con dopamina. Los **paneles A** y **B** corresponden al control negativo sin dopamina, la inmunorreacción positiva de color verde (ALEXA-488) presentó una fuerte señal en la pieza media, similar a lo obtenido en la **figura 12** (**paneles C** y **D**). Además, se observó señal en la pieza principal del espermatozoide. En la **figura 13**, los **paneles C** y **D** (dopamina 0,1 μM), **E** y **F** (dopamina 1 μM), **G** y **H** (dopamina 10 μM) no muestran considerables variaciones sobre la intensidad de p-Akt sobre la pieza media, sin embargo, al observar con mayor detalle la cabeza de los espermatozoides en los diferentes tratamientos (**paneles B'**, **D'**, **F'**, **H'**), se puede observar un aumento de la proteína p-Akt (Ser-473) sobre esta región al aumentar la concentración de dopamina. Además, la señal sobre la pieza principal parece experimentar también un leve aumento al aumentar la concentración de dopamina.

Esta aproximación cualitativa sugiere que la activación del receptor D2 por dopamina es capaz de producir un efecto sobre la intensidad y localización de p-Akt Ser-473 sobre espermatozoides frescos de toro.

Figura 17: Efecto de dopamina en la localización subcelular de la proteína p-Akt-S-473 en espermatozoides de bovino: Espermatozoides frescos de toro fueron lavados e incubados con diferentes concentraciones de dopamina por 30 minutos, luego fueron fijados en Histochoice y esparcidos en porta objetos. **A)** y **B)** Control sin dopamina. **C)** y **D)** Dopamina 0,1 μ M. **E)** y **F)** Dopamina 1 μ M. **G)** y **H)** Dopamina 10 μ M. **B')**, **D')**, **F')**, **H')** Amplificación de la región de la cabeza del espermatozoide. La detección fue realizada con anti-p-Akt-S-473 hecho en conejo (1:100) y detectada con anti-conejo unido a ALEXA-488 (color verde). El control muestra una fuerte detección de p-Akt Ser-473 y al estimular con dopamina se observa la aparición de la proteína activa en la región de la cabeza del espermatozoide. Las imágenes fueron obtenidas por microscopia confocal (barra 10 μ m).



4.8 Análisis de Western blot de la activación de p-Akt Ser-473 en extractos proteicos de espermatozoides de bovino.

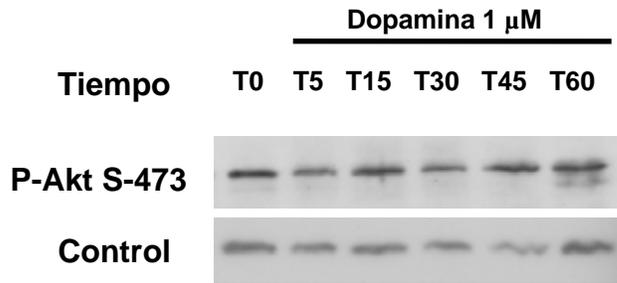
Con el objetivo de corroborar los antecedentes cualitativos obtenidos en el experimento anterior (**figura 17**), se realizó un análisis de la cinética de activación por dopamina de la proteína Akt fosforilada en Ser-473 a través de experimentos de Western blot. Para esto, se incubaron espermatozoides frescos de bovino con dopamina 1 μ M por diferentes tiempos y además, con diferentes concentraciones de dopamina por 1 hora. La extracción de proteínas totales se realizó utilizando inhibidores de fosfatasas como se describe en la sección 3.2.13, separadas por electroforesis, transferidas a membranas de PVDF y las proteínas sometidas a detección inmunológica como se describe en la sección 3.2.16.

En la **figura 18**, **paneles A y B** se muestra el resultado de la cinética de estimulación por dopamina de p-Akt Ser-473 sobre espermatozoides de bovino. En la gráfica normalizada (**panel B**) se puede observar que la activación de la proteína p-Akt Ser-473 podría tener un carácter oscilatorio, el cual no es observado en el experimento control (**panel C y D**). Sin embargo, en el experimento control también se observó una leve tendencia al aumento en la fosforilación (**panel D**).

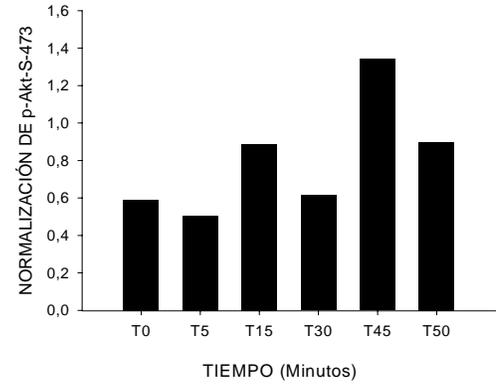
En la **figura 18**, **paneles E y F** se muestra el resultado de la activación de p-Akt Ser-473 por diferentes concentraciones de dopamina después de 1 hora de tratamiento. Al observar la gráfica normalizada (**panel F**) no se logró determinar un efecto diferencial en la activación de Akt al utilizar diferentes concentraciones de dopamina y al analizar las muestras después de 1 hora de estimulación.

Figura 18: Análisis de Western blot de la activación de p-Akt Ser-473 en extractos proteicos de espermatozoides de bovino. A) Cinética de estimulación con dopamina 1 uM. **B)** Gráfica de normalización cinética dopamina 1 uM. **C)** Cinética control sin dopamina. **D)** Gráfica de normalización cinética sin dopamina. **E)** Efecto de diferentes concentraciones de dopamina después de 1 hora de tratamiento. **F)** Gráfica de normalización con diferentes concentraciones de dopamina. Las extracciones de proteína se realizaron utilizando los inhibidores de fosfatasas Ortovanadato de Na⁺ y NaF. El análisis densitométrico de bandas y normalización de p-Akt-S-473 se realizó utilizando el programa UNI-SCAN-IT versión 4.1 y el programa SigmaPlot 8.0.

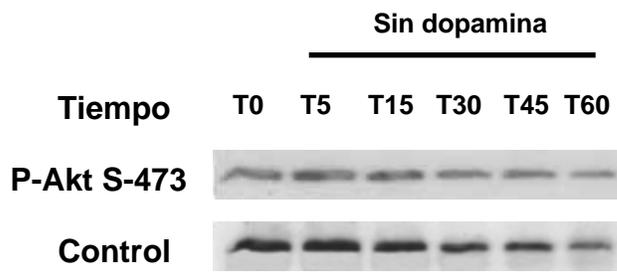
A



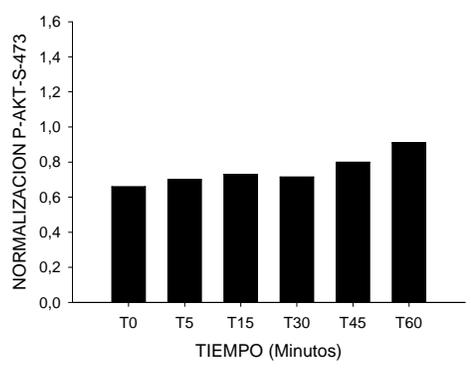
B



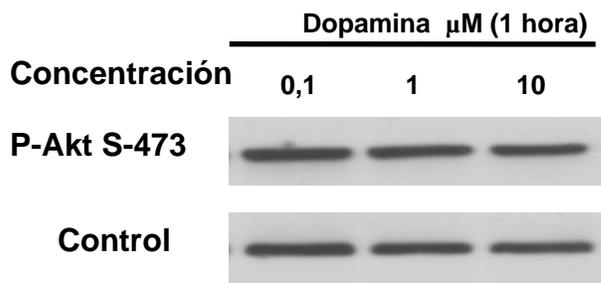
C



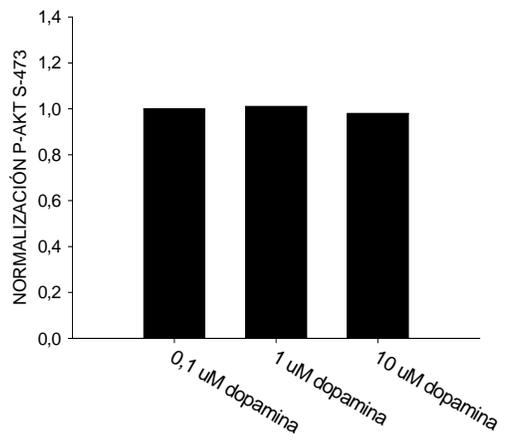
D



E



F

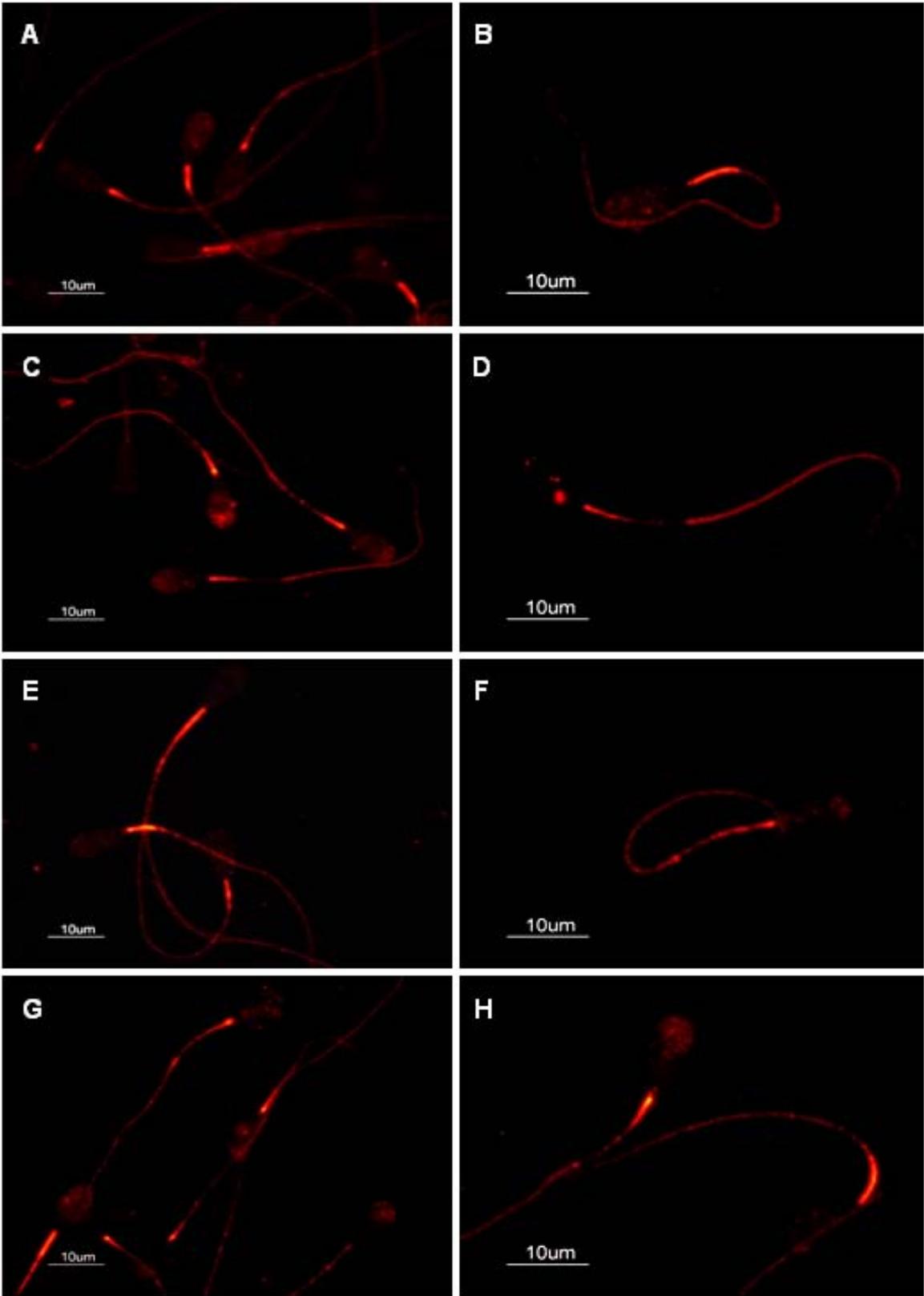


4.9 Efecto de dopamina sobre la fosforilación en tirosinas en espermatozoides frescos de bovino.

El análisis del patrón de fosforilación en tirosinas es ampliamente utilizado como prueba funcional para medir el efecto de agonistas sobre la inducción de capacitación espermática, evento fisiológico propio de este tipo celular (Visconti y col., 1998). Sin embargo, en este estudio no se utilizaron condiciones de capacitación, ya que el objetivo era determinar si el espermatozoide contaba con un receptor D2 funcional en espermatozoides frescos no capacitados. Por otro lado, se ha descrito en diferentes líneas celulares que el receptor D2 es capaz de activar a la tirosina quinasa c-Src y al factor de crecimiento epidermal, produciendo aumentos de fosforilación en residuos de tirosinas (Lajiness y col., 1993), (Nair y col., 2003b). Con el objetivo de analizar de una manera global el efecto de dopamina sobre el nivel de fosfo-Tyr, espermatozoides frescos de bovino fueron analizados por inmunocitoquímica y Western blot después de 1 hora de tratamiento con diferentes concentraciones de dopamina.

La **figura 19** muestra la inmunodetección de p-Tyr sobre espermatozoides frescos de bovino después de 1 hora de tratamiento con dopamina. En el tratamiento control sin dopamina (**paneles A y B**) se observa la detección de p-Tyr en la región mitocondrial cercana a la cabeza y levemente en la pieza principal. Al tratar con dopamina no fue posible establecer diferencias con el tratamiento sin dopamina. El mismo resultado se encontró en los análisis de Western blot (**figura 20**), donde se detectaron 6 bandas predominantes en el experimento control y en los diferentes tratamientos con dopamina, indicando que dopamina no tiene un efecto aparente sobre la fosforilación en tirosina en espermatozoides bajo estas condiciones experimentales.

Figura 19: Efecto de dopamina sobre la fosforilación en tirosinas en espermatozoides de bovino: Espermatozoides frescos de bovino fueron lavados e incubados con diferentes concentraciones de dopamina por 1 hora, luego fueron fijados en Histochoice y esparcidos en porta objetos. **A)** y **B)** Control sin dopamina. **C)** y **D)** Dopamina 0,1 μM . **E)** y **F)** Dopamina 1 μM . **G)** y **H)** Dopamina 10 μM . La detección fue realizada con anti-p-Tyr hecho en ratón (dilución 1:100) y detectada con anti-ratón unido a ALEXA-588 (rojo). El control muestra la detección de p-Tyr en el primer tercio mitocondrial de la pieza media (**panel A**) y al estimular con dopamina no se observan mayores diferencias. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia.



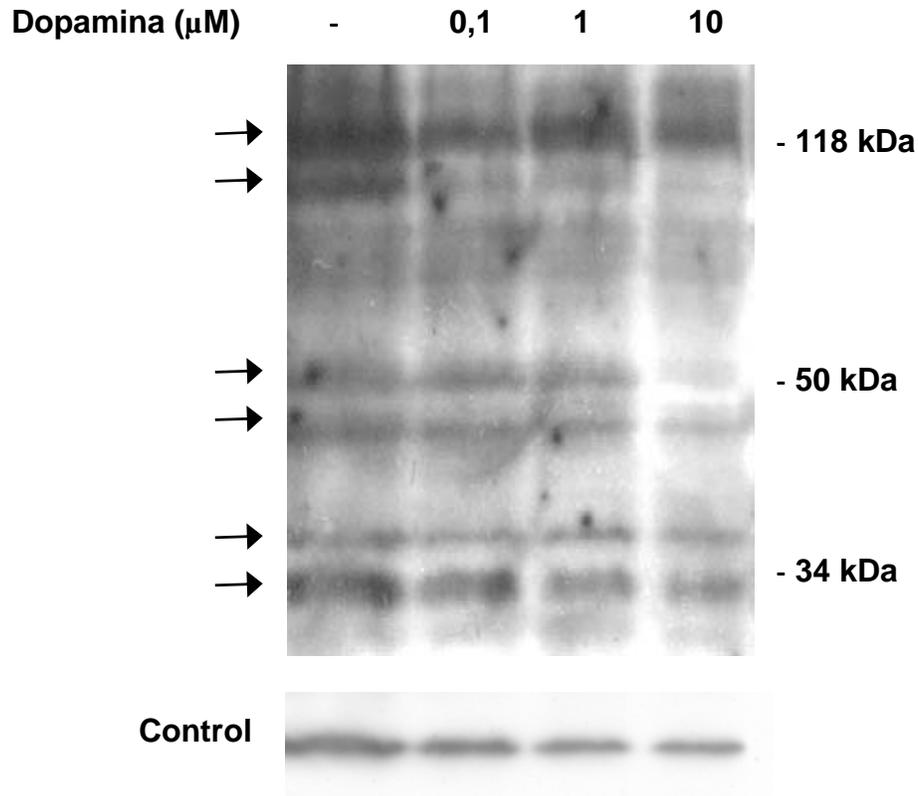


Figura 20: Análisis de Western blot de fosfo-tirosinas en espermatozoides frescos de toro después de 1 hora de estimulación con dopamina. Los espermatozoides fueron lavados e incubados con diferentes concentraciones de dopamina (sin dopamina, dopamina **0,1 μM** , dopamina **1 μM** y dopamina **10 μM**) por **1 hora** y posteriormente se realizó la extracción de proteínas utilizando inhibidores de fosfatasa. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas de membranas de PVDF, incubadas con anti-fosfotirosinas (dilución 1:1000) y reveladas por el método de ECL. El control de carga se realizó con anti- β -tubulina.

4.10 Efecto de dopamina sobre la viabilidad celular de espermatozoides frescos de bovino.

Este estudio se realizó basados en los antecedentes bibliográficos que demuestran que el receptor D2 es capaz de aumentar la viabilidad celular a través de la activación de la vía PI3K-Akt y proteger a las neuronas de un efecto tóxico como el H₂O₂ o glutamato inhibiendo la apoptosis (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003a). La viabilidad espermática fue medida a través del método de eosina-negrosina descrito anteriormente en la sección 3.2.18.

En la **figura 21, paneles A y B** se muestra la viabilidad de espermatozoides tratados con diferentes concentraciones de dopamina por 30 minutos (**panel A**) y por 1 hora (**panel B**), según se describe en la sección 3.2.19.2. Si bien se observa un leve aumento en la viabilidad de los espermatozoides después de 1 hora de incubación con diferentes concentraciones de dopamina (**panel B**), esta no presentó significancia estadística ($p > 0,05$).

Para estudiar si la dopamina era capaz de proteger a los espermatozoides frente a un efecto tóxico como H₂O₂, los espermatozoides fueron incubados con dopamina ó GM-CSF por 30 minutos y luego incubados con H₂O₂ 10 mM como se describe en la sección 3.2.19.2. En la **figura 21, paneles C y D** se muestra la viabilidad espermática medida después de 30 minutos (**panel C**) y 1 hora (**panel D**) de incubación con H₂O₂. En ambos tratamientos (**paneles C y D**) se observó un aparente efecto protector de dopamina frente al H₂O₂, sin embargo, los tratamientos no mostraron significancia estadística ($p > 0,05$). El factor de crecimiento GM-CSF fue utilizado como control positivo en los estudios de protección (Donnelly y col., 2002), (Werner, 2004)

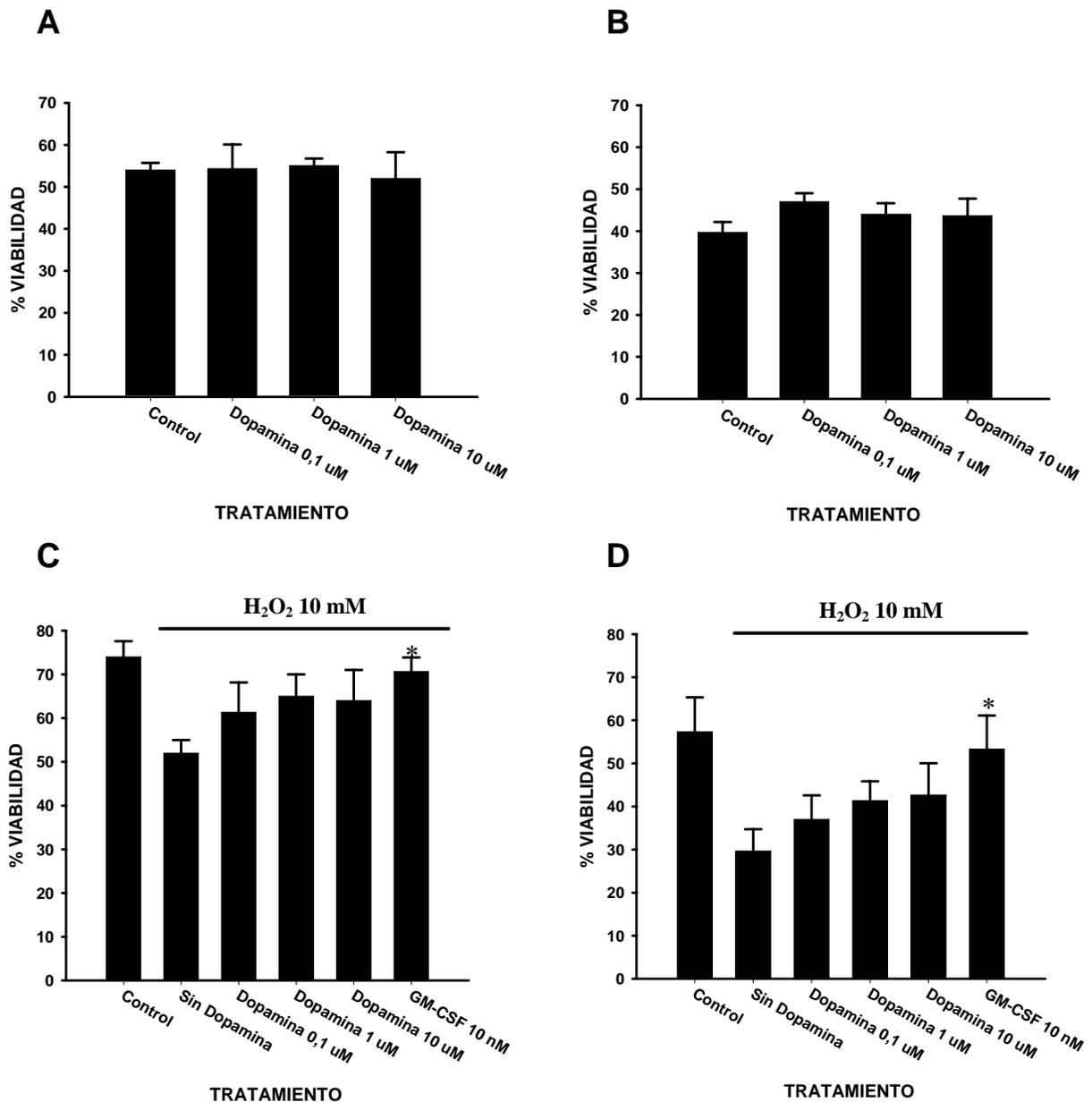


Figura 21: Efecto de dopamina en la viabilidad de espermatozoides frescos de toro. A) y B) Viabilidad medida después de 30 minutos (**panel A**) y 1 hora (**panel B**) de incubación con dopamina. **C) y D)** Incubación con diferentes concentraciones de dopamina o GM-CSF por 30 minutos y posterior tratamiento con H₂O₂ 10 mM. La viabilidad fue medida después de 30 minutos (**panel C**) y 1 hora (**panel D**) de incubación con H₂O₂. En todos los tratamientos la viabilidad fue medida por el método de eosina-negrosina (* = P < 0,05).

4.11 Análisis de Western blot de p-Akt Ser-473 en espermatozoides de bovino tratados con dopamina y enfrentados al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno.

Espermatozoides frescos de bovino fueron lavados e incubados con dopamina o GM-CSF por 30 minutos y luego enfrentados al efecto tóxico de H₂O₂ 10 mM por 1 hora como se describe en la sección 3.2.19.2. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales usando inhibidores de fosfatasa como se describe en la sección 3.2.13. Los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE al 10% y transferidos a membranas de PVDF que fueron posteriormente incubadas con anti-p-Akt Ser-473 y reveladas por el método de ECL. El análisis densitométrico de bandas y normalización se realizó utilizando el programa UNI-SCAN-IT versión 4.1 y el programa SigmaPlot 8.0.

En la **figura 22** se muestra el resultado del Western blot de p-Akt Ser-473 después de 1 hora de incubación con H₂O₂ 10 mM. En la **figura 22, panel A** se observa claramente la aparición de una banda de menor tamaño molecular (banda 2) solamente cuando los espermatozoides son sometidos al efecto tóxico del H₂O₂. Esta nueva banda podría corresponder a otras isoformas de la proteína Akt activa, las cuales han sido descritas anteriormente (Datta y col., 1999). También se observa en la gráfica normalizada de la banda 1 (**figura 22, panel B**), que al incubar a los espermatozoides con H₂O₂ se produce un aumento de la activación de p-Akt Ser-473 con respecto al control sin H₂O₂. Además, al incubar con dopamina o GM-CSF a los espermatozoides antes del tratamiento con H₂O₂, se observa una leve baja en la intensidad de la banda 1. Por otro lado, la intensidad de la banda 2 (**figura 22, panel C**) aumenta levemente cuando los espermatozoides son incubados con dopamina o GM-CSF antes de ser enfrentados al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno.

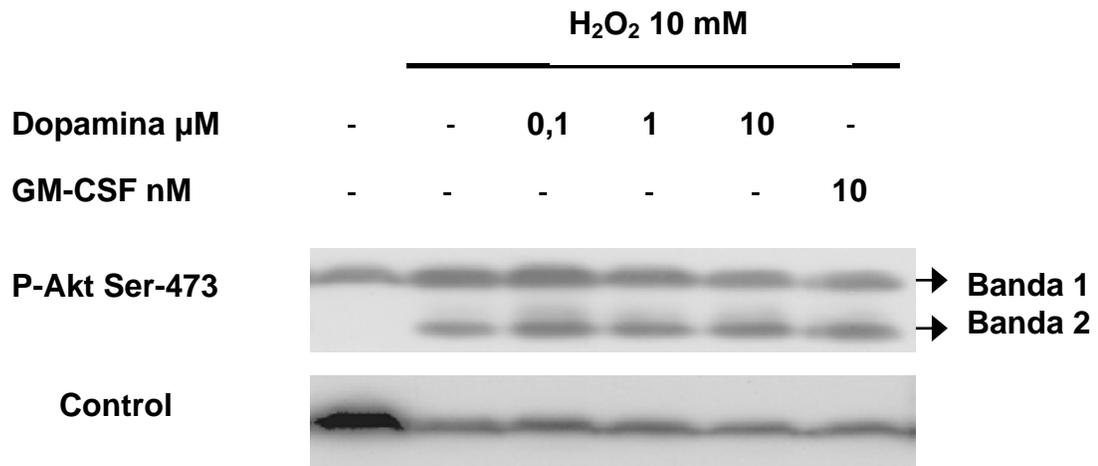
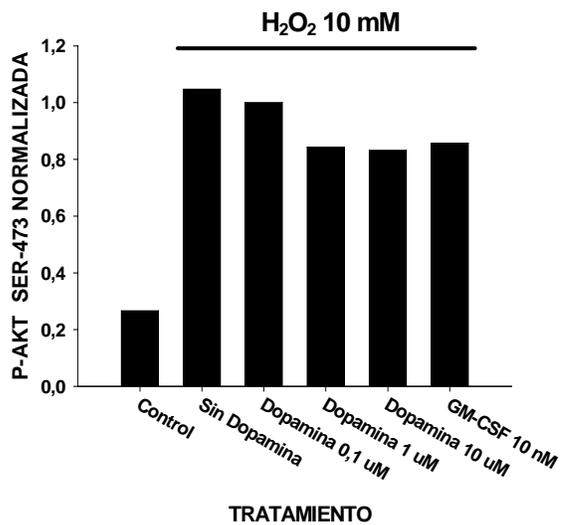
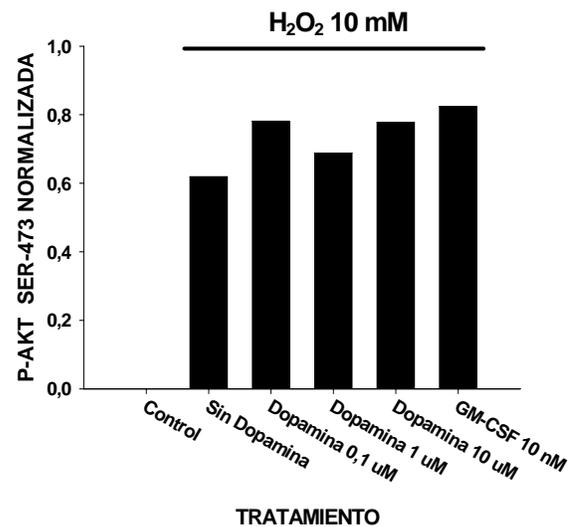
A**B****C**

Figura 22: Análisis de Western blot de p-Akt Ser-473 de espermatozoides frescos de bovino después de 1 hora de incubación con H₂O₂ 10 mM. Los espermatozoides fueron incubados por 30 minutos con los agonistas y luego enfrentados a 10 mM H₂O₂ por 1 hora. **A)** En esta figura se observa que la incubación con H₂O₂ estimula la aparición de una nueva banda fosforilada que podría corresponder a otra isoforma de Akt activa. **B)** Normalización de la banda 1. **C)** Normalización de la banda 2.

4.12 Efecto de dopamina sobre el transporte de 3-O-metilglucosa (3-OMG) en espermatozoides frescos de bovino.

Resultados publicados anteriormente por nuestro laboratorio han demostrado que algunos factores de crecimiento y citoquinas que activan la vía PI3K-Akt y favorecen la viabilidad celular (Yasui y col., 2002), son capaces de aumentar también el transporte de glucosa en espermatozoides de bovino y humanos (Zambrano y col., 2001, Vilanova y col., 2003, Rauch y col., 2004). Similar a estos factores de crecimiento, se ha propuesto que la dopamina es capaz de aumentar la viabilidad celular a través de la activación de la vía PI3K-Akt (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003a). Para explorar la posibilidad que la dopamina pueda tener algún efecto estimulador sobre el transporte de glucosa producto de la activación de la vía PI3K, espermatozoides frescos de bovino fueron lavados y ajustados a una concentración de 5×10^8 células/ml, incubados de diferentes concentraciones de dopamina y sometidos al análisis del transporte de glucosa como se describe en la sección 3.2.19.3.

En la **figura 23** se muestra el resultado obtenido para el transporte de OMG (0,5 mM) en espermatozoides frescos de bovino después de ser estimulados con dopamina por 30 minutos (**panel A**) y 1 hora (**panel B**). En la gráfica mostrada en el **panel A** (30 minutos de tratamiento), se observa que la incubación con dopamina produce una aparente baja en el transporte de OMG con respecto al control sin dopamina, sin embargo, este resultado no presenta significancia estadística ($p > 0,05$). Por otro lado, en el **panel B** (1 hora de tratamiento) no se observaron diferencias significativas entre los ensayos con y sin dopamina ($p > 0,05$).

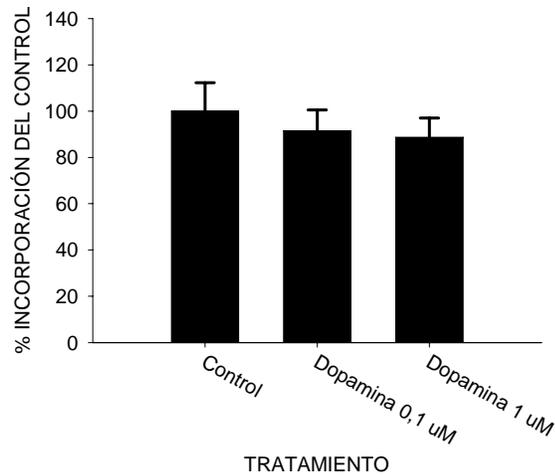
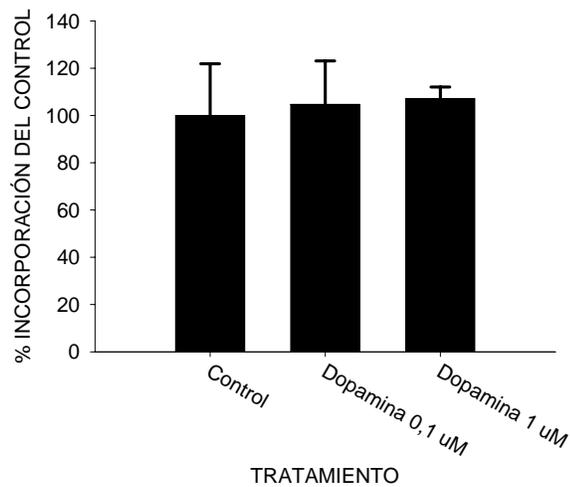
A**B**

Figura 23: Efecto de dopamina en el transporte de 3-OMG (0,5 mM) en espermatozoides de bovino. La concentración de espermatozoides fue ajustada a 5×10^8 células/ml y luego estimulados con diferentes concentraciones de dopamina a 37°C. El transporte se realizó midiendo la incorporación de 3-OMG por 15 segundos a 4°C después de 30 minutos (**panel A**) y 1 hora (**panel B**) de estimulación con dopamina. El ensayo se realizó en triplicado y el resultado del transporte se muestra como porcentaje de incorporación de 3-OMG respecto al control sin estímulo.

5. DISCUSION

Después del descubrimiento de la dopamina como un neurotransmisor en el año 1957 por Arvid Carlsson y el estudio de su mecanismo de acción por Paul Greengard en la década de los 60, se llegó finalmente a la conclusión que existían dos tipos de receptores para dopamina basados sólo en sus características farmacológicas. Un tipo de receptor de dopamina activaría a la AC para producir cAMP (tipo D1) y el otro tipo de receptor inhibiría a la AC (tipo D2), (Kebabian y col., 1979). Sin embargo, no se logró clonar un receptor para dopamina hasta el año 1988, cuando Bunzow y col., describieron por primera vez el cDNA de un receptor de dopamina inhibitorio para la acumulación de cAMP (tipo D2), el que fue obtenido del RNA total de un cerebro de rata (Bunzow y col., 1988). De aquí en adelante, con la clonación de otros receptores de dopamina, la cantidad de estudios ligados a la señalización dopaminérgica creció exponencialmente llegando incluso al desarrollo de fármacos para tratar patologías complejas como la esquizofrenia y el Parkinson. El impacto causado por el estudio ligado a la señalización dopaminérgica llevó más tarde al reconocimiento de la comunidad científica de los aportes hechos por Carlsson y Greengard otorgándoles el premio Nobel de fisiología y medicina en el año 2000.

Sin embargo, la compleja organización y regulación de las vías dopaminérgicas en el cerebro, sumado a los distintos efectos intracelulares observados para un mismo receptor dependiendo del tipo celular donde sea estudiado y considerando que los receptores de dopamina participan en la transmisión sináptica lenta, modulando la acción de otras proteínas como canales iónicos, quinasas, fosfatasas y la acción de otros receptores, ha dificultado el completo entendimiento de la participación de los

receptores de dopamina en el control del movimiento, en los diferentes tipos de conducta y personalidad y como su desregulación terminan desencadenando estados patológicos como el Parkinson, esquizofrenia y la adicción.

La constante búsqueda de fármacos con afinidad para un tipo de receptor de dopamina en particular dirigido a tratar patologías relacionadas con el SNC y que no posean efectos adversos en el resto del organismo, ha sido el objetivo de muchas empresas farmacéuticas en el mundo. En la búsqueda de este tipo de fármacos se observó que algunos agonistas y antagonistas dopaminérgicos tenían efectos periféricos no relacionados con el SNC sugiriendo la presencia de receptores de dopamina periféricos, llegándose a demostrar posteriormente la presencia de receptores para dopamina en el sistema cardiovascular, renal, adrenal y mesentérico (Missale y col., 1998). Sin embargo, los fármacos disponibles en la actualidad están restringidos principalmente a sus efectos antipsicóticos, anti-Parkinsonianos y anti-hiperprolactinérmicos los cuales son consumidos por vía oral, atraviesan la barrera hemato-encefálica y ejercen su efecto sobre el SNC. Por otro lado, la utilización de drogas dirigidas para receptores de dopamina periféricos sólo queda restringido al uso de dopamina en dosis moderadas por vía endovenosa ($2-10 \mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) para tratar cuadros de insuficiencia circulatoria aguda (SHOCK), ya que la dopamina es capaz de aumentar la contracción del miocardio y producir vaso-dilatación renal generando finalmente un aumento en la presión del pulso con disminución de la resistencia periférica (Ruiz y col., 1979), (De la Cal y col., 1984). El uso de dopamina resulta seguro debido a que no atraviesa la barrera hemato-encefálica y su vida media es de alrededor de 2 minutos. Sin embargo, el uso de agonistas y antagonistas a nivel

sistémico (que tienen una estructura principalmente aromática) y dirigidos hacia el SNC, no pueden descartar el efecto sobre receptores periféricos que estén incluso protegidos por barreras biológicas como la barrera hemato-testicular.

Otro efecto periférico observado para agonistas de receptores de dopamina fue su capacidad de inducir erección del pene en ratas y humanos y producir la emisión seminal después de un estímulo prolongado actuando posiblemente a nivel del SNC (Hull y col., 1992), (Heaton y col., 2000). Los estudios realizados posteriormente por Hyun y col., pretendían responder la pregunta si además del efecto sobre el SNC, podría existir un efecto a nivel local. Sus trabajos realizados en tejido eréctil y glándulas accesorias demostraron simultáneamente la expresión de receptores tipo D1 y D2 en la vesícula seminal de rata y humano (Hyun y col., 2002a) y en el cuerpo cavernoso del pene de rata (Hyun y col., 2002b). En ambos trabajos los receptores fueron asociados a la musculatura lisa tanto del pene como de las vesículas seminales, sugiriéndose que el efecto pro-eréctil y la emisión seminal pudieran ser mediados en parte por la estimulación de estos receptores dopaminérgicos periféricos.

La presencia de receptores de dopamina en tejidos periféricos ha despertado el interés de su estudio con el objetivo de comprender la función que cumplen en estos tejidos y cómo esas funciones son alteradas por la activación o la inhibición por fármacos que normalmente son usados para tratar una patología que afecta a un receptor de dopamina en el SNC.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de dopamina en el testículo (Campos y col., 1990) e incluso algunos autores han propuesto la existencia de tipos celulares similares a neuronas con la capacidad de sintetizar catecolaminas (Mayerhofer y col.,

1996), (Mayerhofer y col., 1999b), (Frungeri y col., 2000). Además, los estudios de Romero y col., (2004) demostraron también el fenotipo catecolaminérgico de las células de Leydig.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que el testículo dispone de la maquinaria enzimática para la síntesis de catecolaminas y por lo tanto, de una fuente intratesticular de dopamina que pudiera estar involucrada en la regulación de la espermatogénesis (Mayerhofer y col., 1999b), (Frungeri y col., 2000), (Romero y col., 2004).

Basados en estos antecedentes que sugerían la participación de receptores de dopamina en la fisiología testicular se decidió estudiar específicamente la expresión del receptor de dopamina tipo D2 debido a su capacidad de generar variadas respuestas celulares vinculadas con supervivencia, proliferación, crecimiento y modulación de la función de otras proteínas (Lajiness y col., 1993), (Luo y col., 1998), (Welsh y col., 1998), (Hernández-López y col., 2000), (Banihashemi y col., 2002), (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003), (Jarrahian y col., 2004).

Debido a la creciente evidencia de la capacidad del receptor D2 de activar la vía PI3K-Akt en cultivos primarios de neuronas y en líneas celulares favoreciendo viabilidad celular y además, con la capacidad de proteger a las células frente a condiciones tóxicas como glutamato o peróxido de hidrógeno (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003), se decidió estudiar en esta tesis, adicionalmente a la expresión del receptor D2 en línea germinal masculina, el efecto de dopamina sobre la viabilidad celular de espermatozoides aislados, utilizándose exclusivamente para los estudios funcionales, espermatozoides de bovino debido a su fácil obtención y calidad.

En la presente tesis, se utilizaron diferentes aproximaciones experimentales como RT-PCR, inmunodetección en cortes de testículo, en células aisladas y análisis de Western blot para demostrar la presencia del receptor de dopamina tipo D2 en línea germinal masculina. Para los estudios de RT-PCR se utilizaron partidores previamente descritos en la literatura (Wang y col., 2000), los que tienen la ventaja adicional de poder discriminar entre las dos isoformas descritas para el receptor D2 amplificando tamaños de distinto peso molecular y que son fácilmente separados y visualizados en geles de agarosa al 2%. Como controles positivos se utilizaron cerebros de rata y neuronas corticales, los cuales son ampliamente aceptados por la comunidad científica debido a que el cerebro, corresponde al primer tejido donde el receptor de dopamina D2 fue descrito (Bunzow y col., 1988). Al realizar un análisis de RT-PCR, tanto en tejido cerebral como en el testículo de rata, se logró amplificar dos productos de distinto tamaño molecular (Figura 6, paneles 1, 2 ,3). El producto de menor tamaño, fue de 234 pb, el cual corresponde a la isoforma corta del receptor D2 (D2S) y el producto de mayor tamaño, fue de 321 pb, el cual corresponde a la isoforma larga del receptor D2 (D2L). La diferencia de 87 pb entre ambas isoformas corresponde a un evento de procesamiento alternativo del RNA y se produce por la pérdida del exón 6 en la isoforma corta (D2S), traduciéndose en una diferencia de 29 aa en el tercer lazo intracitoplasmático, lugar que es clave para la unión de la subunidad alfa de la proteína G al receptor, sugiriendo la posibilidad de diferencias funcionales entre ambas isoformas (Guiramand y col., 1995), (Usiello y col., 2000), (Lindgren y col, 2003). Los tamaños observados en la reacción de amplificación de RT-PCR (D2S= 234 pb y D2L=321 pb) y la diferencia observada de 87 pb, coinciden íntegramente con los

resultados obtenidos por Wang y col. (2000), trabajo que describe los partidores utilizados en esta tesis. Por otro lado, se observó que el producto de mayor tamaño (D2L) en el RT-PCR fue amplificado en mayor proporción tanto en los controles cerebrales como en testículo, resultado que también ha sido descrito por otros autores y que refuerza una vez más la hipótesis de diferencias funcionales entre ambas isoformas (Usiello y col., 2000). Sin embargo, debemos tener presente que en pequeñas regiones cerebrales (como la sustancia negra), la isoforma corta (D2S) es la predominante (Khan y col., 1998) y por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad que la isoforma corta pueda ser predominante en algún estado de desarrollo del testículo o en algún estado de diferenciación de la línea germinal masculina.

Otra aproximación experimental utilizada para demostrar la presencia del receptor D2 en testículo de rata fue el análisis de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal. Con el objetivo de conocer la inmunolocalización del receptor en un tejido maduro con una continua producción de espermatozoides (adulto) y en un tejido inmaduro sin producción de espermatozoides (pre-púber), se utilizaron cortes de testículo de una rata de 60 días de edad (adulto) y testículos de una rata de 6 días de edad (pre-púber). Los túbulos seminíferos de la rata pre-púber corresponden a un tejido inmaduro que está formado por las células de Sertoli y los gonocitos (células que posteriormente darán origen a la línea germinal masculina). Al realizar la inmunodetección se encontró que el receptor estaba localizado exclusivamente sobre los gonocitos (Figura 7, paneles A y B), sugiriendo que la expresión del receptor D2 en este estado de desarrollo del testículo de rata se encuentra restringido sólo a la línea germinal masculina. Por otro lado, el testículo adulto mantiene una continua producción

de espermatozoides y dentro del túbulo seminífero se puede observar las células de Sertoli y células de la línea germinal masculina en diferentes estados de diferenciación, como espermatogonias, espermaticitos, espermátidas y espermatozoides (Figura 2, panel A). Al realizar la inmunodetección del receptor D2 sobre el tejido testicular adulto, se encontró que el receptor estuvo presente sobre toda la línea germinal masculina y además se observó que las células de menor estado de diferenciación y que se encuentran ubicadas hacia la membrana basal del túbulo seminífero (espermatogonias), presentaron una señal más intensa comparada con las otras células germinales del túbulo seminífero (Figura 8, panel B).

Con el objetivo de corroborar la presencia del receptor D2 en células germinales masculinas aisladas de testículos de ratas adultas (para eliminar el componente somático representado por las células de Sertoli), se utilizó el método de separación en gradiente de BSA (1,5%-3,5%), con el que solamente es posible obtener espermaticitos y espermátidas aisladas. Al realizar la inmunodetección del receptor D2 sobre estas células aisladas, se observó que el receptor D2 estuvo presente sobre espermaticitos y espermátidas de rata (Figura 9, paneles A y C). Además, la señal observada sobre espermaticitos fue de una mayor intensidad que la producida sobre las espermátidas, sugiriendo que podría existir una cantidad diferencial de receptor entre estos dos tipos celulares. Sin embargo, una metodología distinta debería ser utilizada (como el análisis por RT-PCR y Western blot cuantitativo) para demostrar que cantidades distintas de mRNA o receptor están presentes en células con diferente estado de diferenciación (espermatogonias, espermaticitos, espermátidas). También, con el objetivo de corroborar la presencia del receptor D2 en la línea germinal

masculina y además comparar el peso molecular descrito para el receptor D2 en la literatura, se realizaron estudios de Western blot con un anticuerpo policlonal utilizando extractos proteicos de cerebro, neuronas, testículo y espermatozoides de rata. En el Western blot directo se observó una banda que migró aproximadamente a los 50 kDa, tamaño esperado para los monómeros del receptor D2 (D2S y D2L) (Mosma y col., 1989) y además, se observaron bandas de mayor tamaño molecular (Figura 12, panel A). Diferentes autores utilizando anticuerpos generados en forma independiente han observado también una gran variabilidad en los tamaños detectados para el receptor D2, encontrando tamaños moleculares que van desde los 40 kDa hasta los 220 kDa dependiendo de su estado de glicosilación y el tipo celular donde sean expresados (Grigoriadis y col., 1988), (Jarvie y col., 1988), (Clagett y col., 1989), (Farooqui y col., 1992), (Fishburn y col., 1995), (Grunewald y col., 1996). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado una evidencia adicional que puede ayudar a explicar las bandas de mayor peso molecular. Algunos autores han demostrado que el receptor D2 es capaz de homodimerizar *in vivo* y formar complejos de mayor tamaño molecular, los cuales serían resistentes a la denaturación por SDS (Zawarynski y col., 1998), (Lee y col., 2003), (Guo y col., 2003), incluso las dos isoformas descritas para el receptor D2 (D2L y D2S) también serían capaces de formar oligómeros entre ellos (Gazi y col., 2003). Además de los eventos de homodimerización entre receptores D2, se ha descrito la heterodimerización del receptor D2 con receptores de somatostatina (Rocheville y col., 2000), receptores de adenosina A_{2A} (Canals y col., 2003), (Kamiya y col., 2003), receptores de cannabinoides CB1 (Kearn y col., 2005) y receptores D1 (So y col., 2004), donde el heterodímero puede adquirir la capacidad de activar vías de señalización que

no son observadas cuando se expresan los receptores en forma independiente (Lee y col., 2004), (Jarrahian y col., 2004), (Wu y col., 2005). Además, algunos de estos receptores también son expresados en el testículo, como los receptores de somatostatina (Zhu y col., 1998), los receptores de adenosina A1 y A2_A (Adeoya-Osiguwa y col., 2002) y el receptor de cannabinoides CB1 (Gye y col., 2005), existiendo la posibilidad de la formación de heterodímeros los que podrían tener un rol insospechado en fisiología testicular y espermática.

Debido a las múltiples bandas detectadas en el Western blot directo y con el objetivo de obtener un resultado con bandas más definidas, se realizó una inmuprecipitación del receptor D2 utilizando un anticuerpo policlonal (hecho en conejo) y detectando con un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo (hecho en ratón). El anticuerpo monoclonal detectó una banda de 50 kDa correspondiente a la forma monomérica del receptor D2 (Mosma y col., 1989), corroborándose de esta manera la presencia del receptor de dopamina tipo D2 en la línea germinal masculina de rata, bovino y humano (Figura 12, panel B). Una posible explicación para este resultado puede ser, que el anticuerpo monoclonal interaccione mejor con la forma monomérica del receptor D2, o bien que el anticuerpo policlonal inmunoprecipite mejor a la forma monomérica del receptor D2.

La posible participación funcional del receptor D2 en el testículo adulto o inmaduro es desconocida. Además, debido a la gran variabilidad de señales generada por el receptor D2 dependiendo del tipo celular donde se exprese, hacen difícil aventurar con relativa certeza su rol funcional en células germinales masculinas. Por otro lado, la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa, que participa en la síntesis de

catecolaminas como dopamina (Figura 1, panel A), ha sido descrita en testículos de cerdo, monos y humanos, restringiéndose la presencia de la enzima a terminaciones nerviosas eferente, a células similares a neuronas y a las células de Leydig (Lakomy y col., 1997), (Mayerhofer y col., 1999b), (Frungeri y col., 2000), (Romeo y col., 2004), todas localizadas fuera del túbulo seminífero y que estarían dando cuenta de la producción local de catecolaminas en el testículo. Otra forma de explicar la posible llegada de dopamina al intersticio testicular podría ser a través del torrente sanguíneo después de ser sintetizada y liberadas a la sangre por las células cromafines de la médula adrenal (Mayerhofer y col., 1999a). Sin embargo, la presencia de dopamina en el fluido íntertubular no garantiza la activación de todos los receptores de dopamina presentes en la línea germinal masculina adulta, ya que a pH fisiológico, el grupo amino de la dopamina se encuentra protonado y cargado positivamente, lo cual impide que la dopamina pueda atravesar membranas y barreras biológicas como la barrera hemato-testicular, pero por otro lado, su forma protonada facilita su acumulación en vesículas para su posterior liberación regulada a través de mecanismos de exocitosis dependiente de calcio (Bonisch y col., 1998). Debido a que no existen antecedentes de la expresión de la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas (Tirosina Hidroxilasa) en las células de Sertoli (basado en los estudios nombrados anteriormente), es probable que no exista síntesis de dopamina en el interior del túbulo seminífero y por lo tanto, la activación del receptor D2 sólo estuviera restringida a tipos celulares menos diferenciados como las espermatogonias, las cuales se encuentran libres del microambiente intratubular producido por la barrera hemato-testicular de las células de Sertoli (Figura 2, panel A). Además, si existiera en el túbulo seminífero adulto la necesidad de

regular los niveles de dopamina o de transportar dopamina al interior del túbulo a través de la barrera hemato-testicular, deberían expresarse proteínas especializadas en este tipo de funciones como el Transportador de dopamina (DAT) y las enzimas catabólicas Monoamino-oxidasa (MAO) y la Catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Figura 2, panel B). Sin embargo, estudios de inmunohistoquímica realizados contra el Transportador de dopamina en testículo de humano adulto, sólo detectaron la presencia de esta proteína en células similares a neuronas, las cuales están localizadas entre los túbulos seminíferos (Mayerhofer y col., 1999b), sugiriendo la posibilidad de que el Transportador de dopamina no sea expresado por las células de Sertoli o las células germinales intratubulares. Sin embargo, otro tipo de análisis (como RT-PCR, hibridación *in-situ*), deberían ser llevados a cabo para descartar la expresión del Transportador de dopamina en las células de Sertoli o en las células germinales intratubulares.

Por otro lado, las células de Sertoli presentes en el túbulo seminífero de la rata pre-púber aún no han formado la barrera hemato-testicular y por lo tanto, los receptores D2 presentes en los gonocitos podrían ser activados directamente por la dopamina. En relación a esto, los estudios de Frungieri y col. (2000) realizados en testículo de monos rhesus, muestran una diferencia de la presencia de células similares a neuronas con relación a la edad, encontrándose la presencia de tipos celulares similares a neuronas expresando Tirosina Hidroxilasa (por lo tanto, produciendo catecolaminas), solamente en machos inmaduros. Este antecedente podría incluso relacionar la activación del receptor D2 con fenómenos de tipo inhibitorios que podrían estar presentes antes de la pubertad en los gonocitos, como la activación de canales de K^+ , produciendo hiperpolarización de membrana celular e impidiendo la activación de canales de calcio

dependientes de voltaje y por otro lado, manteniendo bajos niveles de cAMP, traduciéndose en una señal inhibitoria la cual ya ha sido observada para el receptor D2 en otros tipos celulares (Senogles y col., 1994), (Hernández-López y col., 2000), (Banihashemi y col., 2002) y que podría contribuir a mantener o modular un estado de latencia del gonocito en el testículo pre-púber hasta el inicio de la pubertad, donde señales de tipo hormonales (como factores de crecimiento, LH, FSH, testosterona, etc.) estimularán posteriormente la proliferación y diferenciación de la línea germinal masculina para producir espermatozoides maduros. Además, estas hormonas (después de la pubertad) podrían reducir la proliferación de tipos celulares intratesticulares que producen señales inhibitorias sobre la diferenciación de los gonocitos. Por otro lado, la presencia del receptor D2 en células menos diferenciadas (espermatogonias) y no protegidas por la barrera hemato-testicular en el testículo adulto, podrían estar también asociados a fenómenos de tipo inhibitorios, sin embargo, debido a las claras diferencias hormonales en relación con el testículo inmaduro, podrían incluso hacer considerar la posibilidad que el receptor D2 pueda participar en señales de tipo estimuladoras y que puedan tener relación con proliferación celular, como se ha observado en otros tipos celulares (Lajiness y col., 1993), (Luo y col., 1998). Sin duda, estudios futuros realizados con células aisladas podrán dar luces a la participación funcional del receptor D2 en la fisiología testicular. Sin embargo, ya sea que produzca un efecto inhibitorio, estimulador o modulador de otro receptor, también es importante dirigir estudios para comprender en qué condiciones fisiológicas la dopamina es liberada dentro del fluido testicular y qué concentraciones puede alcanzar. Además, sería interesante saber por cuanto tiempo puede permanecer activa sin ser degradada o transportada a otros

compartimentos como por ejemplo, al interior de los túbulos seminíferos a través de mecanismos que podrían involucrar a un Transportador de Monoaminas Vesicular (VMAT).

Además de los estudios de inmunolocalización del receptor D2 en testículos de ratas maduras e inmaduras, se realizó la inmunolocalización en espermatozoides aislados de diferentes mamíferos (rata, bovino y humano). La localización del receptor D2 en espermatozoides de rata y bovino se presentó en la pieza media, pieza principal y región acrosomal (Figura 10, panel A y Figura 11, panel A, respectivamente). A diferencia de lo observado en rata y en bovino, el espermatozoide humano sólo presentó señal positiva sobre la pieza media y pieza principal y estuvo ausente en la región acrosomal (Figura 11, panel C). Debido a que la conformación estructural del espermatozoide está relacionada con su función, se podría especular que la presencia del receptor D2 en la región acrosomal podría tener alguna participación en la modulación de fenómenos exocíticos como la reacción acrosomal. Por otro lado, la presencia del receptor D2 en la pieza media y pieza principal podría estar relacionada con la modulación de la motilidad o el consumo energético (región mitocondrial). En relación a la participación del receptor D2 en fenómenos exocíticos, existen diversos antecedentes que vinculan al receptor D2 con mecanismos inhibitorios de la secreción a través de su capacidad de activar canales de K^+ , produciendo hiperpolarización de la membrana plasmática e inhibiendo la activación de canales de Ca^{+2} tipo L gatillados por voltaje (Cardozo y col., 1995), (Hernandez-Lopez y col., 2000), (Congar y col., 2001). Es así como se ha demostrado su capacidad de inhibir la secreción de prolactina en la hipófisis (Ben-Jonathan y col., 2001), inhibir la síntesis y liberación de dopamina en

neuronas pre-sinápticas (auto-receptores), (Lindgren y col., 2003), inhibir la secreción de acetilcolina en striatum de rata (Drukarch y col., 1990), (Ikarashi y col., 1997), inhibir la secreción de glutamato en el núcleo accumbens (O`Donnell y col., 1994), striatum (Hsu y col., 1995), hipocampo (Hsu y col., 1996) y en el bulbo olfatorio (Hsia y col., 1999), inhibir la secreción de catecolaminas en la médula adrenal (Bigornia y col., 1990), inhibir la secreción de aldosterona en células de carcinoma adrenocortical (Wu y col., 2001), inhibir la secreción de la bilis inducida por secretina en los colangiocitos de los conductos biliares del hígado (Glaser y col., 2003), inhibir la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β -pancreáticas (Rubi y col., 2005) e inhibir la capacidad de respuesta a la hipoxia en células quimo-receptoras de la carótida, inhibiendo el influjo de Ca^{+2} intracelular (Carrol y col., 2005), entre otros efectos inhibitorios.

En relación a la posible participación del receptor D2 en la fisiología espermática, existen antecedentes que describen un proceso de hiperpolarización de la membrana plasmática asociado al mecanismo de capacitación (Zeng y col., 1995), (Arnoult y col., 1999). La razón fisiológica de la hiperpolarización pareciera estar relacionada con la prevención de la reacción acrosomal espontánea antes del contacto del espermatozoide con el ovocito. Además, se ha observado que cuando la hiperpolarización de membrana es inhibida durante la capacitación *in vitro*, los espermatozoides no son capaces de experimentar la reacción acrosomal al ser enfrentados con zonas pelúcidas obtenidas de ovocitos. Sin embargo, al ser incubados con ionoforos de Ca^{+2} , si son capaces de experimentar la reacción acrosomal, indicando que la vía de transducción de señal para la exocitosis acrosomal inducida por el contacto del espermatozoide con la zona

pelúcida del ovocito es dependiente de la hiperpolarización de membrana del espermatozoide (Zeng y col., 1995). Uno de los actores participantes en el mecanismo de la reacción acrosomal son los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, los cuales son activados por la despolarización de membrana producida por el contacto del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito (Florman y col., 1992), (Arnoult y col., 1996). Sin embargo, este influjo inicial de Ca^{+2} , no sería suficiente para la excitosis acrosomal, sino más bien, participaría en la activación del mecanismo de producción de IP_3 , que al interactuar con receptores intracelulares, producirá una posterior liberación de Ca^{+2} desde la vesícula acrosómica (Walensky y col., 1995) y que terminará por activar a canales de Ca^{+2} tipo SOCs (Store Operated Ca^{+2} Channels) en la membrana plasmática (Parekh y col., 1997), (Darszon y col., 2001). Este aumento sostenido del Ca^{+2} intracelular, producirá en algún momento la fusión de membrana acrosomal externa con la membrana plasmática con la consiguiente liberación de enzimas que favorecen la penetración de la zona pelúcida por parte del espermatozoide y además, permite exponer la membrana acrosomal interna, la cual está especializada para la fusión con el ovocito (Darszon y col., 2001).

Además, el potencial de membrana de un espermatozoide de bovino fresco (y de otros espermatozoides no capacitados) se encuentra en el orden de -30 mV. A este potencial de membrana, los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje tipo L, se encuentran normalmente en un estado inactivo, donde la despolarización de la membrana no es capaz de producir la apertura de los canales dependientes de voltaje para la entrada de Ca^{+2} . Al contrario, el potencial de membrana de un espermatozoide de bovino capacitado, se encuentra en el orden de -60 mV. A este potencial de

membrana los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, pasan de un estado inactivo a un estado cerrado, modo en el cual pueden ser rápidamente abiertos después de un evento de despolarización de membrana (Zeng y col., 1995), (Darszon y col., 2001). Por lo tanto, la adquisición de la hiperpolarización en la membrana plasmática del espermatozoide podría actuar como un “switch” que por una parte asegura la exocitosis acrosomal a través de un evento de despolarización de membrana inducido por la zona pelúcida del ovocito y por otro lado, actuaría ayudando a prevenir la reacción acrosomal prematura antes del contacto del espermatozoide con el ovocito inhibiendo a los canales de calcio activados por voltaje (inhibición del ingreso prematuro de calcio a la región acrosomal).

La ausencia del receptor de dopamina D2 en la región acrosomal en el espermatozoide humano, no descarta la posibilidad que participe en la hiperpolarización de membrana, ya que este evento ocurre en toda la membrana del espermatozoide. Además, se han descrito situaciones donde un receptor en particular sólo puede ser detectado en una región del espermatozoide de acuerdo al estado de capacitación en que se encuentre. También se ha descrito que la capacidad de activar al receptor pareciera estar relacionada con la capacidad de detectarlo por métodos inmunológicos (Adeoya-Osiguwa y col., 2002). Este control de la activación de un receptor de acuerdo al estado de capacitación del espermatozoide pareciera estar relacionado con el estado de fluidez de membrana, pues cuando el espermatozoide se capacita hay una pérdida de colesterol de la membrana y por lo tanto un aumento de la fluidez de membrana (Visconti y col., 1999). Un ejemplo de este fenómeno, son el receptor de adenosina A1 (que inhibe la producción de cAMP) y el receptor de adenosina A2_A (que estimula la

producción de cAMP), ambos receptores están presentes en el espermatozoide maduro (Adeoya-Osiguwa y col., 2002) y la presencia de adenosina ha sido detectada en altos niveles en fluidos reproductivos masculinos (Fabiani y col., 1995) y femeninos (Eppig y col., 1985). La detección del receptor de adenosina A_{2A} (estimulador) en espermatozoides "no capacitados", resulta en una fuerte marca sobre la región acrosomal y pieza principal, mientras que el receptor A₁ (inhibitorio) presenta una distribución similar a A_{2A}, pero mucho más tenue. En los espermatozoides "capcitados" en cambio, la detección del receptor A_{2A} (estimulador) disminuye marcadamente en la región acrosomal, mientras que la detección del receptor A₁ (inhibitorio), se incrementa marcadamente en la región acrosomal (Adeoya-Osiguwa y col., 2002). Al realizar estudios funcionales con un agonista específico del receptor A_{2A} (estimulador) en espermatozoides no capacitados se observa un aumento en la producción de cAMP, motilidad y en los parámetros de capacitación medidos con clortetraciclina (CTC), mientras que el mismo agonista no mostró cambios significativos sobre los mismos parámetros cuando se estimularon espermatozoides capacitados. Al contrario, al estimular con un agonista del receptor A₁ (inhibitorio) a espermatozoides capacitados se observó una inhibición en la producción de cAMP y una reducción en la pérdida acrosomal espontánea, pero no tuvo efecto cuando el mismo ensayo se llevó a cabo con espermatozoides no capacitados (Adeoya-Osiguwa y col., 2002). Estos resultados sugieren una regulación dinámica en la producción de cAMP de acuerdo al estado de capacitación, siendo los receptores A_{2A} (estimuladores) más accesibles en un espermatozoide "no capacitado", favoreciendo la acumulación de cAMP y por lo tanto la capacitación, mientras que en el espermatozoide "capcitado" la accesibilidad

de los receptores A_{2A} (estimuladores) disminuye y aumenta la accesibilidad a los receptores A_1 , que inhiben la acumulación de cAMP, seguramente con el objetivo de evitar una “sobrecapacitación” que pueda llevar a una reacción acrosomal prematura. Este mecanismo podría tener la consecuencia final de aumentar la capacidad fecundante del espermatozoide en el tiempo, aumentando la probabilidad que la reacción acrosomal se produzca por el contacto del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito y no producto de una reacción espontánea antes del contacto con el ovocito. Al igual que la disponibilidad dinámica del receptor A_1 (inhibitorio) en la región acrosomal, el receptor D_2 en el espermatozoide humano podría tener también una regulación dinámica en la capacitación aumentando su presencia en la región acrosomal con la capacitación favoreciendo su activación y por lo tanto, la capacidad de inhibir la acumulación de cAMP, evento observado en otros tipos celulares (Battaglia y col 1985), (Weis y col., 1985) (Onali y col., 1989), (Albert y col., 1990), (Missale y col., 1998), disminuyendo la probabilidad de reacción acrosomal prematura. Además, la activación tardía podría aumentar la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide aumentando la capacidad de los canales de Ca^{+2} tipo L de responder frente a la despolarización de membrana que se produce al contacto del espermatozoide con la zona pelúcida. La consecuencia final de la activación del receptor D_2 podría ser aumentar la capacidad fecundante, por una parte manteniendo bajo los niveles de cAMP en el espermatozoide que ya alcanzó el estado capacitado reduciendo la probabilidad de reacción acrosomal espontánea y por otra parte, aumentando la polarización de membrana plasmática favoreciendo el reclutamiento de los canales de Ca^{+2} tipo L de un estado inactivo a un estado cerrado (estado en el que

son activados por despolarización) aumentando la capacidad de responder acrosómicamente (exocitosis dependiente de calcio) sólo cuando un espermatozoide capacitado llega a tener contacto con la zona pelúcida del ovocito. Otra función que podría tener la activación del receptor D2 podría ser, modular la acción de otros receptores como el receptor CB1. El receptor CB1 está presente en el testículo (Gerard y col., 1991) y en el espermatozoide (Rossato y col., 2005) y su ligando natural, la anandamida (AEA) está presente en los fluidos reproductivos humanos masculinos y femeninos (Schuel y col., 2002a). Además, el espermatozoide cuenta con su propia maquinaria enzimática para sintetizar (NAPE-PLD) y degradar (FAAH) anandamida (Maccarrone y col., 2005). En el cerebro, la enzima encargada de sintetizar anandamida (NAPE-PLD) se encuentra localizada en la membrana plasmática de la neurona post-sináptica. Al despolarizarse la membrana plasmática y aumentar el Ca^{+2} intracelular se activa la enzima y genera anandamida a partir de un tipo de fosfolípido presente en la membrana plasmática (NAPEs). La anandamida producida se une rápidamente a los receptores CB1 presentes en las neuronas pre-sinápticas produciendo la inhibición de los canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje (VSCC), disminución del cAMP y aumento del K^{+} intracelular, resultando en una inhibición de la liberación del neurotransmisor de la neurona pre-sináptica. Luego, la anandamida presente en el espacio sináptico es rápidamente transportada (por un transportador aún no clonado) y degradada por la FAAH que está unida a membranas intracelulares de la neurona post-sináptica, este proceso completo es conocido con el nombre de “señalización endocanabinoide retrógrada” (Alger y col., 2002). En el espermatozoide, el agonista del receptor de anandamida, el AM-356, tiene un efecto bifásico sobre la motilidad hiperactivada. A

bajas concentraciones (0,25 nM) estimula la hipermotilidad (45% aumento a las 4 horas) y a altas concentraciones (2,5 nM) inhibe la hipermotilidad (45% de inhibición después de 1 hora), (Schuel y col., 2002b). Por otro lado, otros autores describen que anandamida al 0,1 μ M y 1 μ M, produce un efecto negativo sobre la motilidad y función mitocondrial del espermatozoide humano, acompañada de hiperpolarización de la membrana plasmática, sin alterar marcadamente la viabilidad (posible estado metabólico de latencia), mientras que anandamida 10 μ M produce una fuerte disminución de la actividad mitocondrial, motilidad y viabilidad (Rossato y col., 2005). También se ha descrito que anandamida y el agonista AM-356 (2-10 pM), reducen la capacidad fecundante del espermatozoide inhibiendo la reacción acrosomal (Schuel y col., 1994), (Schuel y col., 2002b) posiblemente reduciendo el cAMP, activando canales de K^+ , e inhibiendo canales de Ca^{+2} gatillados por voltaje (tipo L, N, P, y Q), mecanismos que son completamente inhibidos por la *Toxina pertussis*, implicando la participación de la proteína $G\alpha_{i/o}$ en este tipo de respuesta inhibitoria (Howlett y col., 2002). Por otra parte, se ha observado que en neuronas que expresan los receptores CB1 (inhibidor de la producción de cAMP) y D2R (inhibidor de la producción de cAMP), la co-estimulación de estos receptores pueden aumentar la producción de cAMP (Glass y col., 1997). El mecanismo implicado en la acumulación de cAMP sería debido a la capacidad del receptor CB1 de acoplarse a la proteína $G\alpha_s$, proceso que es modulado por el receptor D2 (Jarrahian y col., 2004). Además, la co-activación favorecería la formación del heterodímero CB1/D2R que a través de un mecanismo insensible a la toxina pertusis ($G\alpha_s$), estimularía la formación de cAMP (Kearn y col., 2005). En conjunto, estos antecedentes podrían indicar que el receptor CB1 en el espermatozoide

podría actuar en una primera instancia inhibiendo el estado de motilidad hiperactivada y la reacción acrosomal espontánea antes de la llegada al oviducto favoreciendo la motilidad progresiva (Schuel y col., 2002b), (Rossato y col., 2005) y luego, a través de un mecanismo dependiente del receptor D2, podría favorecer la acumulación de cAMP y capacitación en el istmo oviductal (posiblemente sincronizado con la ovulación), favoreciendo la aparición de la motilidad hiper-activada, lo cual le permitiría al espermatozoide despegarse de las células del istmo del oviducto y nadar hacia la ampolla oviductal, lugar en donde podrá concretar su encuentro con el ovocito y llevar a cabo la fecundación (Alfredo Ramírez, datos no publicados). Estos antecedentes, también permiten sugerir que en los espermatozoides de organismos nulos para el receptor D2, la activación de los receptores CB1 por anandamida o Δ^9 THC (compuesto activo de la marihuana), no serían capaces de estimular la capacitación (motilidad hiper-activada) ya que el receptor CB1 no podría acoplarse a la proteína $G\alpha_s$.

Otros antecedentes sobre compuestos que favorecen la capacitación del espermatozoide nacieron de los estudios realizados por Meizel y col., (1978), que motivado por la necesidad de encontrar compuestos que mejoren los parámetros de capacitación y fecundación *in vitro*, realizó estudios con ultrafiltrado de extractos de corteza y médula adrenal. Meizel encontró que al incubar espermatozoides de hamster con los extractos de médula adrenal, aumentaba la motilidad y la reacción acrosomal. Las catecolaminas noradrenalina y adrenalina estaban presentes en altos niveles en la médula adrenal y al utilizarlos en forma pura en los ensayos, imitaron el efecto de los extractos de la médula adrenal sobre los espermatozoides sugiriendo la presencia de receptores α y β -adrenérgicos. (Cornett y col., 1978), (Meizel y col., 1980). Estudios

realizados posteriormente (25 años más tarde), describen por primera vez la presencia de receptores α y β -adrenérgicos en espermatozoides de ratón y humano (Adeoya-Osiguwa y col., 2006), confirmando las predicciones iniciales de Meizel.

Por otro lado, la presencia de catecolaminas ha sido descrita en el fluido oviductal de conejos, bovinos, cerdos y humanos en periodos cercanos a la ovulación (Khatchadourian y col., 1987), (Kotwica y col., 2003), (Kaleczyc, 1994), (Owman y col., 1986). Además, se han detectado mayores niveles de noradrenalina y adrenalina (2-4 veces más) en la región ístmica del oviducto (región cercana al útero), posiblemente causando un efecto estimulador del espermatozoide favoreciendo la capacitación, comparada con la región de la ampolla del oviducto (región cercana al ovario), donde los menores niveles de noradrenalina y adrenalina estarían posiblemente evitando la “sobre-capacitación” y la reacción acrosomal prematura. La dopamina en cambio, ha sido detectada en mayor cantidad en la ampolla (lugar donde ocurre la fecundación) y en el infundíbulo de oviducto (el infundíbulo recibe al ovocito ovulado y lo dirige hacia la ampolla), (Kotwica y col., 2003). Es posible también, que parte de la dopamina presente en el líquido folicular (Bahr y col., 1985), sea vertida en el momento de la ovulación hacia el infundíbulo y la ampolla del oviducto, contribuyendo de esta manera en los niveles de dopamina detectados en estas regiones (Bahr y col., 1985), (Hansen y col., 1991). Por lo tanto, en base a estos antecedentes, es posible especular que el receptor D2 pueda ser activado durante la residencia del espermatozoide en el oviducto (principalmente en la ampolla) y pueda modular la función espermática evitando un estado de “sobre-capacitación” inhibiendo la reacción acrosomal espontánea y contribuyendo a aumentar la probabilidad que un espermatozoide capacitado llegue a

fecundar al ovocito. Este mecanismo activado por el receptor D2 que implica inhibición de la exocitosis, ya ha sido descrito anteriormente para este receptor y se ha demostrado además que es bastante conservado, pudiendo funcionar en una amplia variedad de tipos celulares (Bigornia y col., 1990), (Ikarashi y col., 1997), (Ben-Jonathan y col., 2001), (Carrol y col., 2005). Además, este mecanismo inhibitorio de la secreción, estaría ligado a un evento de hiper-polarización de membrana plasmática producido por la activación de canales de K^+ . La hiperpolarización de membrana del espermatozoide también es clave para el éxito de la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida, por lo tanto, el receptor D2 podría también contribuir a aumentar la sensibilidad para responder al inicio de la reacción acrosomal del espermatozoide, inducido por la zona pelúcida del ovocito.

Sin embargo, a pesar de estos sugerentes antecedentes, también debemos considerar que el posible aporte del receptor D2 en la hiperpolarización de membrana sólo podría ser parcial, ya que han sido descrito en el espermatozoide otros canales de K^+ que son capaces de responder a ATP (similares a los descritos en las células β -pancréaticas) y que podrían contribuir a la hiperpolarización (Acevedo y col., 2006). Estos canales de K^+ son inhibidos por altos niveles de ATP produciendo despolarización de membrana (este mecanismo funciona en las células β -pancréaticas donde el ATP producido por la glicólisis genera la despolarización de la membrana inhibiendo canales de K_{ATP} , esto lleva a un influjo de calcio que estimula la secreción de insulina). En el caso de la capacitación espermática, se ha descrito que los niveles de ATP podrían disminuir con la capacitación (Baker y col., 2004), favoreciendo de esta manera la apertura de estos canales K_{ATP} por donde saldría el K^+ intracelular y por lo tanto,

produciendo la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide que favorecería la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida de ovocito (Acevedo y col., 2006).

Estudios dirigidos a medir el efecto del receptor D2 sobre la activación o inhibición de canales de K^+ o Ca^{+2} en espermatozoides por medio de técnicas como *Patch-Clamp*, podrán dar luces en el futuro del posible aporte de la dopamina, presente mayoritariamente en la región de la ampolla del oviducto, sobre la función espermática relacionas con hiper-polarización de la membrana plasmática e inhibición de la reacción acrosomal prematura.

Otro antecedente interesante observado en la fisiología espermática *in vivo*, corresponde a su capacidad de permanecer viable dentro del tracto reproductivo femenino por mucho más tiempo de lo observado en experimentos *in vitro*. Diversos estudios han descrito que la región ístmica del oviducto actuaría como un reservorio de espermatozoides funcionales, los cuales serían secuestrados por las células epiteliales y podrían permanecer en un estado latente (suprimiendo la motilidad y retardando la capacitación), hasta las horas próximas a la ovulación, donde señales de tipo estimuladoras inducirían la liberación de los espermatozoides permitiendo el paso hasta las regiones más altas del oviducto, siendo el proceso de capacitación el principal requisito para la liberación del espermatozoide del epitelio oviductal (Suarez y col., 1998), (Hunter y col., 1999). El objetivo de retrasar la capacitación a través del secuestro de espermatozoides por el epitelio oviductal antes de la ovulación estaría relacionado por una parte, para sincronizar la llegada de los espermatozoides capacitados a la región superior del oviducto con la ovulación y por otro lado, para

aumentar la viabilidad espermática, aumentando así la probabilidad de encuentro de un espermatozoide capacitado con el ovocito. En todos los mamíferos con excepción del hombre, la probabilidad de encuentro entre los espermatozoides y el óvulo se encuentra aumentada debido a que los mamíferos poseen una adaptación evolutiva llamada “estro”, donde la hembra entra en un periodo de “celo” en el cual aumenta su receptividad al macho y genera compuestos similares a “feromonas” que estimulan al macho a cubrir a la hembra. En todas estas especies, el periodo de “estro” se produce en horas anteriores a la ovulación, garantizando de esta manera la presencia de espermatozoides en el oviducto para la fecundación del ovocito. Sin embargo, en especies como el hombre, donde la receptividad al macho está presente a lo largo de todo el ciclo sexual, la probabilidad de encuentro de un espermatozoide estaría directamente relacionada con la frecuencia de los coitos. En este escenario, el reservorio oviductal presente en el oviducto de la mujer, podría haber adquirido a lo largo de la evolución algunos mecanismos adaptativos (posiblemente similares a los presentes en otras especies) y que favorezcan la retención de espermatozoides en la región oviductal aumentando su viabilidad y sincronizando la capacitación y su “liberación” con la ovulación.

En relación al posible aporte de dopamina en la viabilidad espermática, existen diversos antecedentes que describen por una parte, la presencia de catecolaminas en el oviducto de diferentes especies (Khatchadourian y col., 1987), (Kotwica y col., 2003), (Kaleczyc, 1994), (Owman y col., 1986) y por otro lado, estudios que relacionan al receptor D2 con la activación de vías que favorecen la viabilidad celular (como la vía PI3K-Akt), llegando incluso a proteger a la célula de señales tóxicas como el glutamato

y el peróxido de hidrógeno (Welsh y col., 1998), (Kihara y col., 2002), (Brami-Cherrier y col., 2002), (Nair y col., 2003). Estos antecedentes en conjunto, entregan la base para sugerir, que el receptor D2 presente en los espermatozoides, podría contribuir en la mantención de la viabilidad y posiblemente ser capaz de proteger a los espermatozoides de sustancias tóxicas como glutamato y peróxido de hidrógeno a través de la activación de la vía PI3K-Akt, similar a lo observado en células de tipo neuronal (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003).

La proteína quinasa PI3K, corresponde a un complejo heterodimérico compuesto por una parte, de una subunidad catalítica, que fosforila en la posición 3 el grupo hidroxilo del anillo inositol presente en los fosfatidilinositoles (PtdIns) de la membrana plasmática para generar los productos PtdIns(3,4,5)P₃ y PtdIns(3,4)P₂. El otro componente del heterodímero es la subunidad reguladora, encargada de dirigir la asociación del heterodímero con proteínas presentes en la cara interna de la membrana plasmática, garantizando la cercanía de la subunidad catalítica de PI3K con su sustrato presente en la membrana (Cantley, 2002). La familia de proteínas PI3K se ha dividido en 3 clases basados en las estructuras de los dominios proteicos, especificidad de sustrato y asociación a sus sub-unidades reguladoras. La clase I está compuesta por las sub-unidades catalíticas p110 α , p110 β , p110 δ , las cuales son capaces de interactuar con las sub-unidades adaptadoras (reguladoras) p85 α , p85 β y p55 γ y son activadas principalmente por receptores de factores de crecimiento. El otro componente de la familia es la sub-unidad p110 γ , la cual carece del sitio de unión a la sub-unidad reguladora p-85 y en su lugar, se une a la sub-unidad reguladora p101, la cual es activada por receptores unidos a la proteína G, los cuales median su acción a través de

la sub-unidad $G\beta\gamma$ y posiblemente también involucre a la sub-unidad $G\alpha$ (Katso y col., 2001). La clase II está compuesta por las enzimas PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ y la clase III está compuesta sólo por la enzima Vps34 (Fry, 2001), (Katso y col., 2001). La clase I fue el primer grupo en ser identificado y clonado y corresponde al grupo más estudiado y comprendido (Katso y col., 2001). Las consecuencias funcionales ligadas a la activación de las proteínas PI3K, incluyen diversas funciones celulares como: crecimiento, proliferación, motilidad, diferenciación, tráfico intracelular y sobre-vivencia (Foster y col., 2003).

Uno de los principales efectores río abajo de la enzima PI3K, es la proteína serina/treonina quinasa B (PKB, también conocida como Akt), la cual pertenece a la sub-familia de proteínas quinasas AGC, la que también incluye a la proteína quinasa C y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). Para la proteína quinasa B se han descrito 3 isoformas, las cuales son ampliamente expresadas, PKB α , PKB β , PKB γ (también conocidas como Akt1, Akt2, Akt3), todas ellas contienen un dominio de homología de pleckstrina (dominio PH), el cual se une a los fosfatidilinositoles PtdIns(3,4,5)P₃ y PtdIns(3,4)P₂, generados por la subunidad catalítica de PI3K en la cara interna de la membrana plasmática (Lawlor y col., 2001). Una vez que la PI3K es activada, la PKB es reclutada desde el citosol a la membrana plasmática donde es activada por fosforilación en dos residuos. Uno de los residuos (Thr308 en Akt1) está presente en el dominio quinasa y es fosforilado por la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositoles (PDK1), la fosforilación de este residuo pareciera ser el principal requisito para la activación de la proteína quinasa B (Alessi, 2001). El otro residuo (Ser-473 en Akt1) está localizado en la región C-terminal (dominio no catalítico) llamado

dominio hidrofóbico. El mecanismo de fosforilación de este residuo (Ser-473) pareciera ser controversial, sugiriéndose los mecanismos de auto-fosforilación y la participación de una proteína quinasa 2 dependiente de 3-fosfoinositoles (PDK2), aún no identificada. Sin embargo, el mecanismo de auto-fosforilación está comenzando a ser establecido, debido a que la actividad catalítica intrínseca de Akt es necesaria para la fosforilación de Ser-473 (Toker y col., 2000). Además, la activación por fosforilación de la enzima pareciera ser secuencial, ya que la fosforilación de Ser-473 requiere la previa fosforilación del residuo Thr308 por PDK-1. El aporte de la fosforilación en Ser-473, pareciera ser necesaria para la completa activación de la enzima y además, podría jugar un rol en la interacción con los sustratos de PKB y/o en la estabilización conformacional de la forma activa de la enzima (Lawlor y col., 2001). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la sobre-expresión de PKB tiene un efecto anti-apoptótico en un amplio rango de tipos celulares, retardando la muerte celular (Franke y col., 1997), (Sabbatini y col., 1999). Uno de los blancos de fosforilación de la proteína quinasa B vinculados con viabilidad celular es la proteína BAD, esta proteína forma un heterodímero con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L causando muerte celular. Al fosforilar PKB en la Ser-136 a BAD, impide que esta proteína pueda dimerizar con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L, contribuyendo así a la supervivencia celular (Downward, 1999). Sin embargo, es importante mencionar que no todos los tipos celulares expresan la proteína BAD y que la supervivencia celular puede ser regulada por mecanismos independientes de la fosforilación de BAD y activación por PKB (Hinton y col., 1999), (Harada y col., 1999), (Scheid y col., 1999).

Otro blanco de fosforilación de PKB es la proteína caspasa-9, la cual es una proteasa crucial para la iniciación y posiblemente en los estados tardíos de la apoptosis (Wolf y col., 1999). La fosforilación de la caspasa-9 humana en Ser196 por PKB inhibe su activación y por lo tanto, el inicio de la apoptosis mediada por esta proteasa, contribuyendo de esta manera en la supervivencia celular (Cardone y col., 1998). Por otro lado, también se ha descrito que el sitio de fosforilación de caspasa-9 no estaría presente en el ratón y por lo tanto, la inhibición de caspasa-9 por fosforilación podría no ser un mecanismo anti-apoptótico conservado (Fujita y col., 1999). Sin embargo, algunos trabajos indican que PKB podría actuar sobre mecanismos anteriores a la activación de caspasa-9 como por ejemplo, participando en la mantención de la integridad de la membrana mitocondrial evitando la salida del citocromo c e inhibiendo la formación del apoptosoma (Kennedy y col., 1999). También se ha descrito que PKB participa en la viabilidad celular a través de mecanismos mediados por transcripción génica. Uno de estos mecanismos incluiría la activación indirecta de factores de transcripción como CREB, E2F y NF- κ B, induciendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y favoreciendo la proliferación celular (Du y col., 1998), (Brennan y col., 1997), (Kane y col., 1999). Otro mecanismo, incluiría la fosforilación directa e inhibición de factores de transcripción requeridos para la expresión de moléculas pro-apoptóticas como el ligando Fas (Brunet y col., 1999). Sin embargo, en el espermatozoide, el cual es un tipo celular transcripcionalmente inactivo, estos mecanismos podrían no ser importantes en la mantención de la viabilidad celular.

Con el objetivo de conocer la localización sub-celular de las proteínas implicadas en la cascada PI3K-Akt y la localización de los posibles blancos directos de fosforilación

de PKB que pudieran estar involucrados con la mantención de la viabilidad espermática como las proteínas pro-apoptóticas BAD y caspasa-9, se realizó una inmunodetección de estas proteínas sobre espermatozoides de bovino y humanos. Al detectar la subunidad reguladora p110 β de PI3K sobre los espermatozoides de bovino y humanos, ésta presentó una distribución bastante conservada entre ambas especies (Figura 13), sugiriendo que el receptor D2 presente en ambos espermatozoides, podría llegar a interactuar indirectamente con esta vía de señalización celular principalmente en la pieza media y en el caso del espermatozoide de bovino, también en la región acrosomal. Por otro lado, la detección de las proteínas pro-apoptóticas BAD y caspasa-9 en espermatozoides bovinos y humano presentaron considerables diferencias en sus localizaciones sub-celulares (Figuras 14 y 15). En ambos casos, los anticuerpos utilizados para BAD y caspasa-9 fueron hechos contra las secuencias proteicas humanas. La localización sub-celular de BAD y caspasa-9 en el espermatozoide humano siempre estuvieron presentes en la región mitocondrial, correlacionándose con la función descrita para estas proteínas en la literatura (Figura 14, paneles A y B; Figura 15, paneles A y B). Sin embargo, en el espermatozoide bovino, sólo caspasa-9 presentó una sutil localización mitocondrial y al contrario del espermatozoide humano, caspasa-9 presentó también una fuerte señal en la región acrosomal (Figura 15, paneles C y D). Por otro lado, BAD en el espermatozoide humano, presentó una localización mitocondrial y acrosomal (Figura 14, paneles A y B), mientras que en el espermatozoide bovino, al contrario del espermatozoide humano, BAD presentó una localización principalmente restringida a la cabeza del espermatozoide (Figura 14, paneles C y D). Estas claras diferencias de localización de BAD y caspasa-9 entre los espermatozoides

bovinos y humanos, podría ser explicado por un problema de especificidad del anticuerpo, el cual no estaría reconociendo de una manera óptima las secuencias bovinas de las proteínas BAD y caspasa-9. Además, existe la posibilidad que el anticuerpo utilizado (hecho contra las secuencias humanas) pudiera estar uniéndose de forma inespecífica a una secuencia similar presente en otras proteínas del espermatozoide bovino, localizada en un lugar distinto. Otra explicación podría ser, que las proteínas BAD y caspasa-9 bovinas pudieran estar cumpliendo funciones completamente distintas a las descritas para las proteínas humanas. Sin embargo, la participación de BAD y caspasa-9 en la viabilidad del espermatozoide bovino, tampoco puede ser descartada.

Por otro lado, se hacía necesario conocer la distribución sub-celular y estado de activación de la proteína quinasa B (Akt) sobre espermatozoides frescos de bovino. Para conocer la distribución sub-celular de PKB, se intentó utilizar inicialmente un anticuerpo contra la isoforma PKB α (Akt1) total (hecho contra la forma humana), sin embargo, el anticuerpo no arrojó resultados satisfactorios, por lo que sólo se utilizaron los anticuerpos contra las isoformas fosforiladas de PKB α (región más conservada). En la inmunodetección de las formas fosforiladas de PKB, se encontró que la localización sub-celular de la proteína dentro del espermatozoide, determina marcadamente su estado de fosforilación. La PKB presente en la región mitocondrial (pieza media) del espermatozoide fresco de bovino se encontró fosforilada sobre los residuos Thr-308 y Ser-473 (Figura 16), mientras que la PKB presente en la región acrosomal y ecuatorial del espermatozoide se encontró fosforilada exclusivamente en el residuo Thr-308 (Figura 16, paneles A y B). Estos antecedentes podrían indicar que PKB en el

espermatozoide fresco (no capacitado), podría estar completamente activada en la pieza media, posiblemente participando en funciones relacionadas con viabilidad, motilidad y/o modulación del metabolismo mitocondrial. Mientras que la PKB presente en la zona acrosomal y ecuatorial del espermatozoide, podría encontrarse en un estado intermedio de activación, posiblemente esperando las señales de capacitación que adquirirá el espermatozoide dentro del tracto genital femenino para su completa activación. Esta capacitación espermática podría “capacitar” también a la enzima para reconocer y activar a nuevos sustratos, pues en el caso de la región acrosomal, PKB al estar completamente activada, podría participar preparando la maquinaria molecular para llevar a cabo la exocitosis acrosomal al momento de la fecundación.

Con el objetivo de evaluar si dopamina era capaz de alterar el grado de activación o distribución sub-celular de PKB en espermatozoides de bovino, se realizó una inmunodetección de PKB fosforilada en Ser-473 sobre espermatozoides de bovino incubados con diferentes concentraciones de dopamina. Este análisis cualitativo, arrojó un leve cambio en la distribución sub-celular de PKB fosforilada en Ser-473 en la región inferior de la cabeza al compararlo con los experimentos control (Figura 17, paneles B, D, F, H). En este experimento, no fue posible determinar con precisión si PKB fosforilada estaba localizada dentro del núcleo o en la periferia del núcleo debido a que el citoplasma del espermatozoide en la región inferior de la cabeza es muy reducido. Sin embargo, diferentes antecedentes indican, que PKB puede ser importada al núcleo después de ser activada en la membrana plasmática con el objetivo de fosforilar a varios blancos presentes en el núcleo para inducir su activación o inhibición (Andjelkovic y col., 1997), (Neri y col., 2002), (Hixon y col., 2003). Por otro lado, el alto

grado de activación por fosforilación de PKB en Ser-473 observado en la pieza media del espermatozoide, tanto en los experimentos controles como en los tratamientos con dopamina, no permitió determinar cambios cualitativos dentro de la región mitocondrial (Figura 17). Otro antecedente interesante fue que en ninguno de los experimentos se observó la presencia de PKB fosforilada en Ser-473 dentro de la región acrosomal, indicando que estímulos muy específicos son requeridos para la completa activación de la PKB presente en esta región en particular. Con el objetivo de hacer una evaluación más cuantitativa de los niveles de fosforilación de la proteína PKB, se realizaron estudios de Western blot para medir los niveles de PKB fosforilada en Ser-473 en espermatozoides de bovino incubados con dopamina por diferentes tiempos. El resultado obtenido mostró que la dopamina en el tiempo es capaz de alterar los niveles de fosfo-Ser-473 de PKB, produciendo alzas momentáneas de activación, traduciéndose en una señal de tipo oscilatoria (Figura 18, panel B). Este resultado podría ser interpretado como un discreto aumento de la actividad de la vía PI3K-Akt acompañado de una actividad serina/treonina fosfatasa relativamente elevada, la cual podría ser aumentada aun más, al aumentar la fosforilación, con el objetivo de “evitar” un aumento de la fosforilación en un estado no capacitado, que corresponde a la situación trabajada en esta tesis. Esto podría indicar además, que el proceso de capacitación podría estar acompañado de una posible inhibición de proteínas fosfatasas para favorecer la fosforilación de proteínas. Por otro lado, no fue posible observar un aumento en la cantidad de fosfo-Ser-473 de PKB al tratar con diferentes concentraciones de dopamina (Figura 18, panel F). Una posible explicación para este resultado podría ser que dopamina no sea capaz de aumentar de una manera

significativa la fosforilación en Ser-473 de PKB, debido a que la mayoría de la PKB fosforilada en Ser-473 presente sobre la pieza media del espermatozoide ya se encuentra activada al momento del inicio del ensayo (Figura 16, paneles C y D), sin embargo, el sutil cambio de localización subcelular observado en los experimentos cualitativos con diferentes concentraciones de dopamina mostrados en la Figura 16, podrían sugerir una leve activación de la vía PI3K-Akt que no sería capaz de aumentar la cantidad total de PKB fosforilada en Ser-473 de una manera significativa.

Con el objetivo de evaluar de una manera global posibles cambios sobre otras proteínas fosforiladas mediada por la activación con dopamina en espermatozoides de bovino, se analizaron las proteínas fosforiladas en tirosinas, para lo cual se realizó un análisis de inmunocitoquímica y Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra fosfo-tirosina total. En ambos experimentos, no fue posible establecer claras diferencias entre los tratamientos con dopamina y los experimentos controles (Figuras 19 y 20). Debido a que la fosforilación en tirosina ha sido un mecanismo claramente asociado con el proceso de capacitación (Visconti y col., 1998), una posible explicación para este resultado negativo (donde no se visualizó un significativo aumento de fosfotirosinas) puede ser causado por las condiciones del medio de incubación utilizado en los ensayos con espermatozoides, el cual no está diseñado para facilitar la capacitación, ya que la capacitación no fue establecida como un parámetro a considerar en esta tesis.

Para evaluar el efecto de dopamina sobre la viabilidad espermática, se utilizaron dos aproximaciones. La primera pretendía explorar la posibilidad que dopamina pudiera inhibir el curso normal de mortalidad espermática observada después de la incubación de los espermatozoides *in vitro*, sin embargo, en este tipo de aproximación no se logró

obtener resultados significativos para demostrar un aumento de la viabilidad espermática por dopamina en el tiempo (Figura 21, paneles A y B). La segunda aproximación experimental fue dirigida a evaluar el efecto protector de dopamina frente a condiciones de estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno. En relación a esto, diversos autores han sugerido que las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno y el anión super-óxido, están involucrados en la capacitación y fosforilación de proteínas en el espermatozoide (Griveau y col., 1994), (De Lamirande y col., 1995), (Leclerc y col., 1997) (Aitken y col., 1998). En estudios realizados con espermatozoides bovinos, se demostró que el peróxido de hidrógeno bajo condiciones de capacitación es capaz de producir el mismo patrón de fosforilación en tirosinas que el obtenido con la heparina. La concentración de peróxido de hidrógeno ideal para producir la fosforilación en tirosinas, estuvo en el rango de 50 – 200 μM , mientras a que mayores concentraciones (en el rango mM), este efecto benéfico no fue observado (Rivlin y col., 2004). El posible mecanismo involucrado en la fosforilación de proteínas podría involucrar por una parte, la inhibición de la actividad de proteínas fosfatasas (Hecht y col., 1992), la activación de tirosinas quinasas o ambas, y por otra parte, induciendo la producción de cAMP por activación de la AC y activando a proteínas tirosinas quinasas dependientes de PKA (Aitken y col., 1998), (Rivlin y col., 2004). Debido a estos antecedentes, se decidió utilizar una concentración de peróxido de hidrógeno en el rango mM (10 mM), con el objetivo de inducir daño y la posterior muerte a los espermatozoides (Kemal y col., 2000). En este experimento, se observó un aparente efecto protector de dopamina frente al peróxido, sin embargo, el efecto protector no fue significativo ($p > 0,05$) (Figura 21, paneles C y D). Al analizar que

sucedió con el estado de fosfo-Ser-473 de PKB, se encontró que al estimular a los espermatozoides con peróxido de hidrógeno aumentó el nivel de fosforilación de PKB y además, se produjo la aparición de una segunda proteína fosforilada, la cual puede corresponder una de las isoformas descritas para PKB (Datta y col., 1999) o bien, puede corresponder a una forma de menor tamaño de PKB α , producto de la activación de alguna proteasa por el peróxido de hidrógeno asociada a un mecanismo apoptótico. La interpretación del efecto de la dopamina sobre la fosforilación de PKB en este experimento, no resulta del todo evidente, sin embargo, se observó una disminución de la cantidad de fosfo Ser-473 de PKB α (banda 1) al aumentar la concentración de dopamina, similar a lo observado con GM-CSF (Figura 22, panel B). Como este resultado no se correlaciona con el aparente efecto protector observado en la Figura 22, paneles C y D, una posible explicación para este efecto, podría ser que la dopamina (la cual posee una estructura del tipo aromática, Figura 1, panel A), pudiera estar actuando como una molécula aceptora de radicales libres, disminuyendo el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno, o bien, la dopamina podría estar activando mecanismos distintos a la vías clásicas implicada en viabilidad (PI3K-Akt) y descritas para el receptor D2 en otros sistemas celulares (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003a). Una posible sugerencia para mejorar este poco concluyente experimento relacionado con viabilidad espermática, podría ser repetir estos experimentos utilizando un método de detección más sensible y cuantitativo, como por ejemplo, utilizar una sonda fluorescente para detectar la actividad mitocondrial del espermatozoide marcada de color rojo (como MitoTracker Red) y una sonda fluorescente de viabilidad de color verde (como CytoxCGreen) y analizar ambos parámetros de forma simultánea por

citometría de flujo. Esto con el objetivo de disminuir las desviaciones estándar y obtener información del metabolismo mitocondrial y la viabilidad del espermatozoide al mismo tiempo, ya que el método de viabilidad utilizado en la presente tesis (método de eosina-negrosina) resultó ser muy lento de analizar y además, presenta la desventaja de no ser una técnica del todo comparable con los valores obtenidos por otra persona, ya que el criterio de viabilidad puede variar de acuerdo a la experiencia del experimentador. Otra posibilidad podría ser también, medir el efecto protector de dopamina frente a otros parámetros espermáticos, como la motilidad. A diferencia de la viabilidad, la motilidad es mucho más sensible a ser afectada por el peróxido de hidrógeno (a 10 mM H_2O_2 se produce la inhibición del 100% de la motilidad de los espermatozoides de bovino), por lo tanto, se necesitaría utilizar menores concentraciones de peróxido en los ensayos, haciendo el experimento más cercano a una posible realidad fisiológica con la cual se podría encontrar el espermatozoide, como por ejemplo, el estrés oxidativo generado por radicales libres producto del encuentro con leucocitos activados presentes en el semen o en el tracto genital femenino, los cuales han sido relacionados con infertilidad (Sharma y col., 1996), (Ricci y col., 2002).

Por último, se exploró la posibilidad que dopamina pudiera alterar el transporte de glucosa, en relación a esto, existían algunos antecedentes descritos para otras catecolaminas como la noradrenalina, la cual sería capaz de aumentar el transporte de glucosa en adipocitos de ratón (Chernogubova y col., 2005). Por otro lado, existían también antecedentes de la presencia de transportadores facilitativos de glucosa en los espermatozoides de mamífero (Angulo y col., 1998). Además, resultados publicados anteriormente por nuestro laboratorio habían demostrado que algunos factores de

crecimiento y citoquinas son capaces de aumentar el transporte de glucosa en espermatozoides de bovino y humanos (Zambrano y col., 2001) (Rauch y col., 2004). Estos factores, también son capaces de activar la vía PI3K-Akt, similar a lo descrito para el receptor de dopamina D2 en otros tipos celulares (Kihara y col., 2002), (Nair y col., 2003a). Sin embargo, al realizar los estudios de transporte de glucosa con diferentes concentraciones de dopamina en espermatozoides de toro, no fue posible establecer un efecto de dopamina sobre el transporte de glucosa bajo las condiciones utilizadas en esta tesis (Figura 23, paneles A y B). Este resultado, fue obtenido con espermatozoides no capacitados, sin embargo, sería interesante determinar si la capacitación aumenta el consumo de glucosa y como dopamina podría alterar este proceso, ya que el mecanismo de capacitación está relacionado con un alto consumo energético para la mantención de procesos como la hiper-motilidad. Además, existen antecedentes que indican que la glicólisis anaerobia, sería fundamental para mantener el mecanismo de motilidad espermática y sustentar la capacitación (Travis y col., 2004). Más aún, la eliminación de una enzima glicolítica específica del espermatozoide, la cual es expresada exclusivamente durante la espermatogénesis, produce espermatozoides completamente inmóviles, no pudiendo la mitocondria sustentar energéticamente la motilidad progresiva (Miki y col., 2004). Estos resultados sugieren fuertemente que la mayoría de la energía requerida para la motilidad del espermatozoide es generada principalmente vía glicólisis, más que a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

La presencia del receptor de dopamina D2 en el testículo y en los espermatozoides de varios mamíferos, abre indudablemente un nuevo campo de estudios sobre estos tejidos, los cuales, desde ahora, deberán ser considerados como

nuevos blancos de acción para la dopamina y los agonistas y antagonistas del receptor D2, los cuales son comúnmente utilizados para tratar patologías neuronales, sugiriéndose nuevos e insospechados roles en la fisiología testicular y espermática.

Finalmente, si la dopamina y el receptor D2 participan en la proliferación y/o diferenciación de la línea germinal masculina, o si sólo participan en las funciones espermáticas después de ser liberados dentro del tracto reproductivo femenino, serán materia de estudio para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

- Se demostró por primera vez la expresión de ambas isoformas del receptor de dopamina tipo D2 en línea germinal masculina a través de estudios de RT-PCR.
- Mediante Western blot e inmunolocalización se corroboró la presencia de la proteína en la línea germinal masculina de rata y en los espermatozoides de bovino y humano.
- La inmunodetección de D2R en el espermatozoide fue principalmente en pieza media, pieza principal y en el caso de rata y toro, también se detectó en la región acrosomal.
- No fue posible establecer inequívocamente la participación de dopamina sobre la viabilidad, fosforilación de proteínas y transporte de glucosa en espermatozoides de bovinos no capacitados.

6. BIBLIOGRAFIA

Acevedo J, Mendoza I, Vega J, Treviño C, Felix R, Darszon A. (2006) **K_{ATP} channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation.** *Dev Biol* 289:395-405.

Adams J, Cory S. (1998) **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** *Science* 281:1322–1326.

Adeoya-Osiguwa S, Fraser L. (2002) **Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP.** *Mol Reprod Dev* 63:245-255.

Adeoya-Osiguwa S, Gibbons R, Fraser L. (2006) **Identification of functional {alpha}2- and {beta}-adrenergic receptors in mammalian spermatozoa.** *Hum Reprod* (en prensa).

Aitken R, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine D. (1998) **A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation.** *J Cell Sci* 111:645-656.

Albert P, Neve K, Bunzow J, Civelli O. (1990) **Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion.** *J Biol Chem* 265:2098-2104.

Albert P. (2002) **G protein preferences for dopamine D2 inhibition of prolactin secretion and DNA synthesis in GH4 pituitary cells.** *Mol Endocrinol* 16:1903-1911.

Alessi, DR. (2001) **Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction.** *Biochem Soc Trans* 29:1-14.

Alger BE. (2002) **Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids.** *Prog Neurobiol* 68:241-286.

Andjelkovic M, Alessi D, Meier R, Fernandez A, Lamb N, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq J, Hemmings B. (1997) **Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.** *J Biol Chem* 272:31515-31524.

Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes MA, Slebe JC, Delgado-López F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II. (1998) **Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C.** *J Cell Biochem* 71:189-203.

Arnoult C, Cardullo R, Lemos J, Florman H. (1996) **Activation of mouse sperm T-type Ca^{+2} channels by adhesión to the egg zona pellucida.** *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13004-13009.

Arnoult C, Kazan I, Visconti P, Kopf G, Villaz M, Florman H. (1999) **Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrana hyperpolarization during capacitation.** *Prod Natl Acad Sci USA* 96:6757-6762.

Bahena R, Flores G, Arias J. (2000) **Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central.** *Rev Biomed* 11:39-60.

Bahr J, Ben-Jonathan N. (1985) **Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation.** *Endocrinology* 177:620-623.

Baker M, Hetherington L, Ecroyd H, Roman S, Aitken R. (2004) **Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation.** *J Cell Sci* 117:211-222.

Balk J, Picetti R, Salardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. (1995) **Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors.** *Nature* 337:424-428.

Banihashemi B, Abert P. (2002) **Dopamine-D2S receptor inhibition of calcium influx, adenylyl cyclase, and mitogen-activated protein kinase in pituitary cells: distinct G α and G $\beta\gamma$ requirements.** *Mol Endocrinol* 16:2393-2404.

Battaglia G, Norman A, Hess E, Creese I. (1985) **D2 dopamine receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in rat striatum.** *Neurosci Lett* 59:177-182.

Beal MF. (1992) **Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses?.** *Ann Neurol* 31:119-130.

Ben-Jonathan N, Hnasko R. (2001) **Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor.** *Endocrine Reviews* 22:724-763.

Berrios J, Osses N, Opazo C, Arenas G, Mercado L, Benos D, Reyes J. (1998). **Intracellular Ca $^{2+}$ homeostasis in rat round spermatids.** *Biol. Cell* 90:391-398.

Bigornia L, Allen C, Jan C, Lyon R, Titeler M, Schneider A. **D2 dopamine receptors modulate calcium channel currents and catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells.** *JPET* 252:586-592.

Blakely R, Barman A. (2000) **Biogenic amine transporters: regulation in flux.** *Curr Opin Neurobiol* 10:328-336.

Bodis J, Hartmann G, Torok A. (1993) **Relationship between the monoamine and**

gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment. *Exp Clin Endocrinol* 101:178-182.

Bonisch H, Eiden L. (1998) **Catecholamine reuptake and storage: overview** *Adv Pharmacol* 42:149-164.

Boulton A, Eisenhofer G. (1998) **Catecholamine metabolism: from molecular understanding to clinical diagnosis and treatment: overview.** *Adv Pharmacol* 42: 273-292.

Bowyer J, Weiner N. (1987) **Modulation of the Ca⁺² evoked release of [³H]-dopamine from striatal synaptosomes by dopamine D2 agonist and antagonists.** *J Pharm Exp Ther* 241:27-33.

Bradford M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem* 72:248-254.

Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pages C, Hipskind, Caboche J. (2002) **Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neuron: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation.** *J Neurosci* 22:8911-8921.

Brennan P, Babbage J, Burgering B, Groner B, Reif K, Cantrell D. (1997) **Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F.** *Immunity* 7:679-689.

Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson M, Arden K, Blenis J, Greenberg M. (1999) **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 96:857-868.

Bunzow J, Van Tol H, Grandy D, Albert P, Salon J, Christie M, Machida C, Neve K, Civelli O. (1988) **Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA.** *Nature* 336:783-787.

Campos M, Vitale M, Ritta M, Chiocchio S, Calandra R. (1990) **Catecholamine distribution in adult rat testis.** *Andrologia* 22:247-252.

Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, Benedetti P, Goldberg S, Neve K, Fuxe K, Agnati L, Woods A, Ferre S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. (2003) **Adenosine A_{2A}-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization.** *J Cell Biochem* 278:46741-46749.

Cantley L. (2002) **The phosphoinositide 3-kinase pathways.** *Science* 296:1655-1657.

Cardone M, Roy N, Stennicke H, Salvesen G, Franke T, Stanbridge E, Frisch S, Reed J. (1998) **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 282:1318-1321.

Cardozo D, Bean B. (1995) **Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors.** *J Neurophysiol* 74:1137-1148.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson M. (1957) **3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists.** *Nature* 180:1200.

Carroll J, Boyle K, Wasicko M, Sterni L. (2005) **Dopamine D2 receptor modulation of carotid body type 1 cell intracellular calcium in developing rats.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L910-L916.

Centonze D, Picconi B, Baunez C, Borrelli E, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P. (2002) **Cocaine and amphetamine depress striatal GABAergic synaptic transmission**

through D2 dopamine receptors. *Neuropsychopharmacology* 26:164-175.

Chase T, Oh J, Blanchet P. (1998) **Neostriatal mechanisms in Parkinson`s disease.** *Neurology* 51:S30-35.

Chernogubova E, Hutchinson D, Nedergaard J, Bengtsson T. (2005) **α_1 -and β_1 -adrenoceptor signaling fully compensates for β_3 -adrenoceptor deficiency in brown adipocyte norepinephrine-stimulated glucose uptake.** *Endocrinology* 146:2271-2284.

Choi D, Rothman S. (1990) **The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death.** *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.

Choi E, Jeong D, Won K, Park, Baik J. (1999) **G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors.** *Biochem Biophys Res Commun* 256:33-40.

Chomczynsky P, Sacchi N. (1987) **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 162:156-159.

Clagett-Dame M, McKelvy J. (1989) **N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D2 receptor heterogeneity.** *Arch Biochem Biophys* 274:145-154.

Congar P, Bergevin A, Trudeau L. (2002) **D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels.** *J Neurophysiol* 87:1046-1056.

Cornett L, Meizel S. (1978) **Stimulation of in vitro activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines.** *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4954-4958.

Darszon A, Beltran C, Felix R, Nishigaki T, Treviño C. (2001) **Ion transport in sperm signaling.** *Dev Biol* 240:1-14.

Datta S, Brunet A, Greenberg M. (1999) **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 13:2905-2927.

Dees W, Hiney J, Schultea T, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen G, Ojeda S. (1995) **The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors.** *Endocrinology* 136:5760-5768.

De la Cal M, Miravalles E, Pascual T. (1984) **Dose-related hemodynamic and renal affects of dopamine in septic shock.** *Crit Care Med* 12:22-25.

De Lamirande E, Gagnon C. (1995) **Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa.** *Free Radic Biol Med* 18:487-495.

Diaz J, Levesque D, Griffon N, Lammers C, Martres P, Sokoloff P, Schwartz J. (1994) **Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens.** *Eur J Neurosci* 6:1384-1387.

Donnelly C, Staub C, Forrest D, Varner D, Blanchard T, Love C, Johnson L. (2002) **Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Reduces Testicular Germ Cell Apoptosis in vitro.** *Theriogenology* 54, 377-380.

Downward J. (1999) **How Bad phosphorylation is good for survival.** *Nat Cell Biol* 1:E33-E35.

Drukarch B, Schepens E, Stoof J. (1990) **Muscarinic receptor activation attenuates D2 dopamine receptor mediated inhibition of acetylcholine release in rat striatum: indications for a common signal transduction pathway.** *Neuroscience* 37:1-9.

Du K, Montminy M. (1998) **CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB.** *J Biol Chem* 273:32377-32379.

Eppig J, Ward-Bailey P. (1985) **Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest.** *Biol Reprod* 33:1041-1049.

Fabiani R, Ronquist G. (1995) **Abundance of guanine, guanosine, inosine and adenosine in human seminal plasma.** *Int Clin Lab Res* 25:47-51.

Farooqui S, Prasad C, Ali M. (1992) **Production and characterization of a monoclonal antibody to dopamine D2 receptor: comparison with a polyclonal antibody to a different epitope.** *Biochem Biophys Res Commun* 184:661-667.

Fishburn C, Elazar Z, Fuchs S. (1995) **Differential glycosylation and intracellular trafficking for the Long and Short isoforms of the D2 dopamine receptor.** *J Biol Chem* 270:29819-29824.

Florman H, Corron M, Kim T, Babcock D. (1992) **Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis.** *Dev Biol* 152:304-314.

Foster F, Traer C, Abraham S, Fry M. (2003) **The phosphoinositide (PI) 3-kinase family.** *J Cell Sci* 116:3037-3040.

Franke T, Kaplan D, Cantley L. (1997) **PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.** *Cell* 88:435-437.

Frungieri M, Urbanski H, Hohne-Zell B, Mayerhofer A. (2000) **Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells.** *Neuroendocrinology* 71:43-50.

Fry MJ. (2001) **Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?**. *Breast Cancer Res* 3:304-312.

Fryxell KJ. (1995) **The evolutionary divergence of neurotransmitter receptor and second-messenger pathways**. *J Mol Evol* 41:85-97.

Fujisawa H, Okuno S, (1987) **Regulation of the activity of tyrosine hydroxylase in the central nervous system**. *Adv Enzym Reg* 28:93-110.

Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, Konishi H, Kikkawa U, Momoi T. (1999) **Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9**. *Biochem Biophys Res Commun* 264:550-555.

Ganon WF. (2000) **Fisiología médica**. 17^a Ed. El manual moderno S.A. Mexico DF. Paginas 471-481.

Gartner L, Hiatt J. (2002) **Texto Atlas de Histología**. 2^{da} Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. Capítulo 21.

Gazi L, Lopez J, Rudiger M, Strange P. (2003) **Constitutive oligomerization of human D2 dopamine receptors expressed in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) and in HEK293 cells**. *Eur J Biochem* 270:3928-3938.

Gerard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. (1991) **Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis**. *Biochem J* 279:129-134.

Gerfen C, Engber T, Mahan L, Susel Z, Chase T, Mosma F, Sibley. (1990) **D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons**. *Science* 250:1429-1432.

Giros B, Sokoloff P, Martres M, Riou J, Emorine L, Schwartz J. (1989) **Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms.** *Nature* 342: 923-926.

Glaser S, Alvaro D, Roskams T, Phinizy J, Stoica G, Francis H, Ueno Y, Barbaro B, Marzioni M, Mauldin J, Rashid S, Mancino M, LeSage G, Alpini G. (2003) **Dopaminergic inhibition of secretin-stimulated choleresis by increased PKC- γ expression and decrease of PKA activity.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G683-G694.

Glass M, Felder C. (1997) **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptor augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor.** *J Neurosci* 17:5327-5333.

Gnessi L, Fabri A, Spera G. (1997) **Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment.** *Endocr Rev* 18:541-609.

Goldstein M, Deutch A. (1992) **Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia.** *FASEB J* 6:2413-2421.

Gordon A, Yao L, Jiang Z, Fishburn S, Fuchs S, Diamond I. (2001) **Ethanol acts synergistically with a D2 dopamine agonist to cause translocation of protein kinase C.** *Mol Pharmacol* 59:153-160.

Grandy D, Marchionni M, Makam H, Stofko R, Alfano M, Frothingham L, Fischer J, Burke K, Bunzow J, Server A, Civelli O. (1989) **Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9762-9766.

Grigoriadis D, Niznik H, Jarvie K, Seeman P. (1988) **Glycoprotein nature of D2 dopamine receptors.** *FEBS Lett* 227:220-4.

Griveau J, Renard P, Le Lannou D. (1994) **An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation.** *Int J Androl* 17:300-307.

Group P.S. (2000) **Pramipexole v/s levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a randomized controlled trial.** Parkinson Study Group. *J Am Med Assoc* 284:1931-1938.

Grunewald S, Haase W, Reilander H, Michel H. (1996) **Glycosylation, palmitoylation and localization of the human D2S receptor in baculovirus-infected insect cells.** *Biochemistry* 35:15149-15161

Guiramand J, Montmayeur J, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E. (1995) **Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins.** *J Biol Chem* 270:7354-7358.

Guo W, Shi L, Javitch J. (2003) **The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer.** *J Biol Chem* 278:4385-4388.

Gye M, Kang H, Kang H. (2005) **Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes.** *Arch Androl* 51:247-55.

Hansen C, Srikandakumar A, Downey B. (1991) **Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction.** *Mol Reprod Dev* 30:148 – 153.

Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang L, Taylor S, Scott J, Korsmeyer S. (1999) **Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A.** *Mol Cell* 3:413-422.

Hartmann A, Hunot S, Michel P, Muriel M, Vyas S, Faucheux B, Mouatt A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M. (2000) **Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2875-2880.

Heaton JP. (2000) **Central neuropharmacological agents and mechanisms in erectile dysfunction: the role of dopamine.** *Neurosci Biobehav Rev* 24:561-569.

Hecht D, Zick Y. (1992) **Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun* 189:773-779.

Hecht N.B. (1995) **The making of a spermatozoon: a molecular perspective.** *Dev Gen* 16:95-103.

Hernández-López S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier D. (2000) **D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade.** *J Neurosci* 20:8987-8995.

Hinton H, Welham M. (1999) **Cytokine-induced protein kinase B activation and Bad phosphorylation do not correlate with cell survival of hemopoietic cells.** *J Immunol* 162:7002-7009.

Hixon M, Boekelheide K. (2003) **Expression and localization of total Akt1 and phosphorylated Akt1 in the rat seminiferous epithelium.** *J Androl* 24:891-898.

Hsia A, Vincent J, Lledo P. (1999) **Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb.** *J Neurophysiol* 82:1082-1085.

Ho H, Suarez S. (2001) **Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation.** *Reproduction* 122:519-526

Holstein A, Schulze W, Davidoff M. (2003) **Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment.** *Reprod Biol Endocrinol* 1:107-122.

Howlett A, Barth F, Bonner T, Cabral G, Casellas P, Devane W, Felder C, Herkenham M, Mackie K, Martin B, Mechoulam R, Pertwee R. (2002) **International Union de Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.** *Pharmacol Rev* 54:161-202.

Hunter R, Hagbard H, Greve T. (1999) **Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca⁺² ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir.** *Mol Reprod Dev* 54:283-291.

Hull E, Eaton R, Markowski V. (1992) **Opposite influence of medial preoptic D1 and D2 receptors on genital reflexes: implications for copulation.** *Life Sci* 51:1705-1713.
Hsu K, Huang C, Yang C, Gean P. (1995) **Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum.** *Brain Res* 690:264-268.

Hsu K. (1996) **Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice.** *J Neurophysiol* 76:1887-1895.

Hussain T, Lokhandwala M. (2003) **Renal Dopamine Receptors and Hypertension.** *Exp Biol Med* 228:134-142.

Hyun J, Baig M, Yang D, Leungwattanakij S, Kim K, Abdel-Mageed A, Bivalacqua T, Hellstrom W. (2002a) **Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat and human seminal vesicles.** *J Androl* 23:114-20.

Hyun J, Bivalacqua T, Baig M, Yang D, Leungwattanakij S, Abdel-Mageed A, Kim K,

Hellstrom W. (2002b) **Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat corpus cavernosum.** *BJU International* 90:105-112.

Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T, Maruyama Y. (1997) **Regulation of dopamine D1 and D2 receptors on striatal acetylcholine release in rats.** *Brain Res Bull* 43:107-15.

Jarvie K, Niznik H, Seeman P. (1988) **Dopamine D2 receptor binding subunits of Mr congruent to 140,000 and 94,000 in brain: deglycosylation yields a common unit of Mr congruent to 44,000.** *Mol Pharmacol* 34:91-97.

Jarrahian A, Watts V, Barker E. (2004) **D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor.** *JPET* 308:880-886.

Joyce J, Kaeger C, Ryoo H, Goldsmith S. (1993) **Dopamine D2 receptors in the hippocampus and amygdale in Alzheimer's disease.** *Neurosci Lett* 154:171-174.

Joyce J, Myers A, Gurevich E. (1998) **Dopamine D2 receptor bands in normal human temporal cortex are absent in Alzheimer's disease.** *Brain Res* 784:7-17.

Kaleczyc J. (1994) **Effect of estradiol and progesterone on noradrenaline content in nerves of the oviduct, uterus and vagina in ovariectomized pigs.** *Folia Histochem Cytobiol* 32:119-126.

Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K, Nakata H. (2003) **Oligomerization of adenosine A_{2A} and dopamine D2 receptors in living cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 306:544-549.

Kane L, Shapiro V, Stokoe D, Weiss A. (1999) **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.** *Curr Biol* 9:601-604.

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield M. (2001) **Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis and cancer.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-675.

Kearn C, Blake K, Daniel E, Mackie K, Glass M. (2005) **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk?** *Mol Pharmacol* 67:1697-1704.

Kebabian J, Calne D. (1979) **Multiple receptor for dopamine.** *Nature* 227:93-96.

Kemal N, Morshedi M, Oehninger S. (2000) **Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.** *Fertil Steril* 74:1200-1207.

Kennedy S, Kandel E, Cross T, Hay N. (1999) **Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria.** *Mol Cell Biol* 19:5800-5810.

Khan Z, Mrzijak L, Gutiérrez A, Calle A, Goldman P. (1998) **Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7731-7736.

Khatchadourian C, Menezo Y, Gerard M, Thibault C. (1987) **Catecholamines within the rabbit oviduct at fertilization time.** *Human Reproduction*, 2: 1-5.

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A. (2001) **Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block a beta-amyloid-induced neurotoxicity.** *J Biol Chem* 276:13541-13546.

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Kanki R, Yamashita H,

Akaike A. (2002) **Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade.** *J Neurosc Res* 70:274-282.

King S, Campbell A, Dille E, Roser J, Murphy L, Jones K. (2005) **Dopamine receptors in equine ovarian tissues.** *Domest Animal Endocrinol* 28:405-415.

Knable M, Weinberger D. (1997) **Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia.** *J Psychopharmacol* 11:123-131.

Kotwica G, Kurowicka B, Franczak A, Grzegorzewski W, Wrobel M, Mlynarczuk J, Kotwica J. (2003) **The concentrations of catecholamines and oxytocin receptors in the oviduct and its contractile activity in cows during the estrous cycle.** *Theriogenology.* 60:953-64.

Kujacic M, Hansson L, Calsson A. (1995) **Acute dopaminergic influence on plasma adrenaline levels in the rat.** *Eur J Pharmacol* 273:247-57.

Laemmli U. K. (1970) **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage.** *Nature* 227:680-685.

Laccarino C, Samad T, Mathis C, Kercret H, Picetti R, Borrelli E. (2002) **Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs.** *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14530-14535.

Lachowicz J, Sibley D. (1997) **Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors.** *Pharmacol Toxicol* 81:105-113.

Lakomy M, Kaleczyc J, Majewski M. (1997) **Noradrenergic and peptidergic innervation of the testis and epididymis in the male pig.** *Folia Histochem Cytobiol* 35:19-27.

Lajiness M, Chio C, Huff R. (1993) **D2 dopamine receptor stimulation of mitogenesis in transfected Chinese hamster ovary cells: relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations.** *J Pharmacol Exp Ther* 267:1573-1581.

Lawlor M, Alessi D. (2001) **PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?** *J Cell Sci* 114:2903-2910.

Leclerc P, De Lamirande E, Gagnon C. (1997) **Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives.** *Free Radical Biol Med* 22:643-656.

Lee S, O'Dowd B, Rajaram R, Nguyen T, George S. (2003) **D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrana domain 4.** *Biochemistry* 42:11023-11031.

Lee S, So C, Rashid A, Varghese G, Cheng R, Lanca A, O'Dowd B, George S. (2004) **Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal.** *J Biol Chem* 279:35671-35678.

Lí Z, Pham T, Chen J, Gershon M. (2004) **Enteric Dopaminergic Neuron: Definition, Developmental Lineage, and Effects of Extrinsic Denervation.** *J Neurosci* 24:1330-1339.

Lida M, Miyazaki I, Tanaka K, Kabuto H, Iwata-Ichikawa E, Ogawa N. (1999) **Dopamine D2 receptor mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, a dopamine agonist.** *Brain Res* 838:51-59.

Lindgren N, Usiello A, Goigny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G. (2003) **Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the**

regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4305-4309.

Luo Y, Kokkonen G, Wang X, Neve K, Roth G. (1998) **D2 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis toxin-sensitive G proteins and Ras-involved ERK and SAP/JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells.** *J Neurochem* 71:980-990.

Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli M, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. (2005) **Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction.** *J Cell Sci* 118:4393-4404.

Mason J, Kozell L, Neve K, (2002) **Regulation of dopamine D1 receptor trafficking by protein kinase A-dependent phosphorylation.** *Mol Pharmacol* 61: 806-816.

Mayerhofer A, Danilchick M, Lara H, Pau F, Russell L, Ojeda S. (1996) **Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic and an intragonadal source of catecholamines.** *Biol Reprod* 55:509-519.

Mayerhofer A, Frungieri M, Bulling A, Fritz S. (1999a) **Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads.** *Medicina.* 59:542-545.

Mayerhofer A, Frungieri M, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt H.(1999b) **Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies.** *J Androl* 20:341-7.

Mayerhofer A, Fritz S, Grunert R, Sanders S, Duffy D, Ojeda S, Stouffer R. (2000) **D1-receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and**

human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 84:257-264.

Meizel S, Working P. (1980) **Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro.** *Biol Reprod* 22:211-216.

Meizel S. (2004) **The sperm, a neuron with a tail: “neuronal” receptors in mammalian sperm.** *Biol Rev* 79:713-732.

Miki K, Qu W, Goulding E, Willis W, Bunch D, Strader L, Perreault S, Eddy E, O'Brien. (2004) **Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility.** *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16501-16506.

Missale C, Castelletti L, Memo M, Carruba M, Spano P. (1988) **Identification and characterization of postsynaptic D1- and D2-dopamine receptors in the cardiovascular system.** *J Cardiovasc Pharmacol* 11:643-50.

Missale C, Nash R, Robinson S, Jaber M, Caron M. (1998) **Dopamine receptors: From structure to function.** *Physiological rev* 78: 189-225.

Monsma F, McVittie L, Gerfen C, Mahan L, Sibley D. (1989) **Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing.** *Nature* 342: 926-929.

Montmayeur J, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E. (1991) **Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms.** *FEBS Lett* 278:239-243.

Mruk D, Cheng Y. (2004) **Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ cell interaction and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis.** *Endocrine Reviews* 25:747-806.

Nair V, Olanow C, Sealfon S. (2003a) **Activation of phosphoinositide 3-kinase by D2 receptor prevents apoptosis in dopaminergic cell lines.** *Biochem J* 373: 25-32.

Nair V, Sealfon S. (2003b) **Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor.** *J Biol Chem* 278:47053-47061.

Nair V, Olanow C, Sealfon S. (2003) **Activation of phosphoinositide 3-kinase by D2 receptor prevents apoptosis in dopaminergic cell lines.** *Biochem J* 373: 25-32.

Namkung Y, Sibley D. (2004) **Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization and trafficking of the D2 dopamine receptor.** *J Biol Chem* 279: 49533-49541.

Neff N, Hadjiconstantinou M. (1995) **Aromatic L-amino acid decarboxylase modulation and Parkinson`s disease.** *Prog Brain Res* 106: 91-97.

Neri L, Borgatti P, Capitani S, Martelli A. (2002) **The nuclear phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new second messenger system.** *Biochim Biophys Acta* 1584:73-80.

Nestler E, Aghajanian G. (1997) **Molecular and cellular basis of addiction.** *Science* 278:58-62.

Nishi A, Snyder G, Greengard P. (1997) **Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine.** *J Neurosci* 17:8147-8155.

O`Donnell P, Grace A. (1994) **Tonic D2-mediated attenuation of cortical excitation in nucleus accumbens neurons recorded in vitro.** *Brain Res* 634:105-112.

Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto T, Zhang Z, Hirota K, Miyake A.

(1994) **Dopamine inhibits THR-induced MAP kinase activation in dispersed rat anterior pituitary cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 201:642-648.

Olanow C, Jenner P, Brooks D. (1998) **Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease.** *Ann Neurol* 44:S167-S174.

Onali P, Olianas M. (1989) **Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens.** *Neurosci Lett* 102:91-96.

Owman C, Stjernquist M, Helm G, Kannisto P, Sjoberg N, Sundler F. (1986) **Comparative histochemical distribution of nerve fibres storing noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) in human ovary, fallopian tube, and uterus.** *Med Biol* 64:57-65.

Parekh A, Penner R. (1997) **Store depletion and calcium influx.** *Physiol Rev* 77:901-930.

Pizzolato G, Chierichetti F, Fabbri M, Cagnin A, Dam M, Ferlin G, Battistin L. (1996) **Reduced striatal dopamine receptors in Alzheimer's disease: single photon emission tomography study with the D2 tracer [¹²³I]-IBZM.** *Neurology* 47:1065-1068.

Prince FP. (1996) **Ultrastructural evidence of adrenergic, as well as cholinergic, nerve varicosities in relation to the lamina propria of the human seminiferous tubules during childhood.** *Tiss Cell* 28:507-513.

Rauch M, Brito M, Zambrano A, Espinoza M, Perez M, Yañez A, Rivas C, Slebe JC, Vera JC, Concha I. (2004) **Differential signaling for enhanced hexose uptake by IL-3 and IL-5 in male germ cells.** *Biochem J* 380:1-7.

Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino, Presani

G. (2002) **Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes.** *Hum Reprod* 17:2665-2672.

Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. (2004) **Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction.** *Biol Reprod* 70:518-522.

Robbins T, Everitt B. (1999) **Drug addiction: bad habits add up.** *Nature* 398: 567-570.

Rocheville M, Lange D, Kumar U, Patel S, Patel R, Patel Y. (2000) **Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity** *Science* 288: 154-157.

Romeo R, Pellitteri R, Russo A, Marcello M. (2004) **Catecholaminergic phenotype of human Leydig cells.** *Ital J Anat Embryol* 109:45-54.

Roosen-Runge E.C. (1977) **The process of spermatogenesis in animals.** Cambridge: Cambridge University Press 1977.

Rossato M, Popa I, Ferigo M, Clari G, Foresta C. (2005) **Human sperm express cannabinoid receptor CB1 which activation inhibits motility, acrosome reaction and mitochondrial function.** *J Clin Endocrinol Metab* 90:984-991.

Rubi B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, Maechler P. (2005) **Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion.** *J Biol Chem* 280:36824-36832.

Ruiz C, Weil M, Carlson R. (1979) **Treatment of circulatory shock with dopamine. Studies on survival.** *JAMA* 242:165-168.

Sabbatini P, McCormick F. (1999) **Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis.** *J Biol Chem* 274:24263-24269.

Sato Y, Wada H, Horita H. (1995) **Dopamine release in the medial preoptic area during male copulatory behavior in rats.** *Brain Res* 692:66-70.

Scheid M, Schubert K, Duronio V. (1999) **Regulation of Bad phosphorylation and association with Bcl-X_L by the MAPK/Erk kinase.** *J Biol Chem* 274:31108-31113.

Schuel H, Goldstein E, Mechoulam R, Zimmerman A, Zimmerman S. (1994) **Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduce sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7678-7682.

Schuel H, Burkman L, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida (2002a) **N-Acylethanolamines in human reproductive fluids.** *Chemistry and Physics of Lipids* 121:211-227.

Schuel H, Burkman L, Lippes J, Crickard K, Mahony M, Giuffrida A, Picone R, Makriyannis A. (2002b) **Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization.** *Mol Reprod Dev* 63:376-387.

Seeman P, Nizkik H. (1990) **Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia.** *FASEB J* 4:2737-244.

Seeman P, Kapur S. (2000) **Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7673-7675.

Sharma R, Agarwal A. (1996) **Role of reactive oxygen species in male infertility.** *Urology* 48:835-850.

Senogles S. (1994) **The D2 dopamine receptor mediates inhibition of growth in**

GH4ZR7 cells: involvement of protein kinase-C. *Endocrinology* 134:783-789.

So C, Varghese G, Curley K, Kong M, Alijaniam M, Ji X, Nguyen, O`Dowd, George S. (2005) **D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor.** *Mol Pharmacol* 68:568-578.

Suarez S. (1998) **The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation.** *Biol Reprod* 58:1105-1107.

Swanson J, Castellanos F, Murias M, Lahoste G, Kennedy J. (1998) **Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder.** *Curr Opin Neurobiol* 8:236-271.

Takashima H, Tsujihata M, Kishikawa M, Freed W. (1999) **Bromocriptine protects dopaminergic neurons from levodopa-induced toxicity by stimulating D2 receptors.** *Exp Neurol* 159:98-104.

Toker A, Newton A. (2000) **Akt/Protein Kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site.** *J Biol Chem* 275:8271-8274.

Travis A, Tutuncu L, Jorgez C, Ord T, Jones B, Kopf G, Williams C. (2004) **Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilización in the mouse.** *Biol Reprod* 71:139-145.

Tsang V, Peralta J, Simona A. (1983) **Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis.** *Meth Enzymol* 92, 377-391.

Usiello A, Baik J, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza P, Borrelli E. (2000) **Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors.** *Nature* 408:199-203.

Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meidolesi J, Civelli O. (1990) **Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk-fibroblasts, hyperpolarization and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells.** *J Biol Chem* 265:10320-10326.

Vilanova L, Rauch M, Zambrano A, Brito M, Werner E, Alfaro V, Cox J, Concha I. (2002) **“Expression of GM-CSF in male germ cells: GM-CSF enhances sperm motility”.** *Biol Reprod* 66:179.

Visconti P, Kopf G. (1998) **Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation.** *Biol Reprod* 59:1-6.

Visconti P, Galantino-Homer H, Ning X, Moore G, Valenzuela J, Jorgez C, Alvarez J, Kopf S. (1999) **Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation.** *J Biol Chem* 274:3235-3242.

Vivanco I, Sawyers C. (2002) **The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways in human cancer.** *Nature Reviews* 490:489-501.

Walensky L, Snyder S. (1995) **Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm.** *J Cell Biol* 130:857-869.

Walker W, Cheng J. (2005) **FSH and testosterone signaling in Sertoli cells.** *Reproduction* 130:15-28.

Welsh G, Hall D, Warnes A, Strange P, Proud C. (1998) **Activation of microtubule-associated protein kinase (Erk) and p70 S6 kinase by D2 dopamine receptors.** *J Neurochem* 70:2139-2146.

Weiss S, Sebben M, Garcia-Sainz J, Bockaert J. (1985) **D2-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture.** *Mol Pharmacol* 27:595-599.

Werner E. (2004) **Participación de GM-CSF en la supervivencia de células germinales masculinas.** Tesis doctoral. Escuela de graduados. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Wolf B, Green D. (1999) **Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.** *J Biol Chem* 274:20049-20052.

Wu J, Hablitz J. (2005) **Cooperative activation of D1 and D2 dopamine receptors enhances a hyperpolarization-activated inward current in layer I interneurons.** *J Neurosci* 25:6322-6328.

Wu K, Chen Y, Chu T, Chueh S, Wu M, Bor-Shen H. (2001) **Expression and localization of human dopamine D2 and D4 receptor mRNA in the adrenal gland, aldosterone-producing adenoma and pheochromocytoma.** *J Clin Endocrinol Metab* 86:4460-4467.

Yamane H, Funk B. (1993) **Covalent modification of protein G.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:201-241.

Yan Z, Feng J, Fienberg A, Greengard P. (1999) **D2 dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons.** *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11607-11612.

Yao L, Arolfo M, Dohrman D, Jiang Z, Fan P, Fuchs S, Janak P, Gordon A, Diamond I. (2002) **By dimmers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption.** *Cell* 109:733-743.

Yasui K, Sekiguchi Y, Ichikama M, Nagumo H, Yamazaki T, Komiyama A, Suzuki H. (2002) **Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through I-type phosphoinositide 3-kinase.** *J Leukoc Biol* 72:1020-1026.

Zambrano A, Noli C, Rauch M, Werner E, Brito M, Amthauer R, Slebe J, Vera J, Concha I. (2001) **Expression of GM-CSF receptors in, germinal cells and their role in signaling for increased hexose and vitamin C transport.** *J Cell Biochem* 80, 625-634.

Zawarynski P, Talerico T, Seeman P, Lee SP, O'Dowd BF, George SR. (1998) **Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain.** *FEBS Lett* 441:383-386.

Zeng Y, Clark E, Florman H. (1995) **Sperm membrane potential: hiperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion.** *Dev Biol* 171:554-563.

Zhu L, Krempels K, Bardin C, O'Carroll A, Mezey E. (1998) **The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, 3 in rat testis.** *Endocrinology* 139:350-357.

Zigmond M, Schwarzschild M, Rittenhouse A (1989) **Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation.** *Ann Rev Neurosci* 12: 415-461.

Zirkin B, Chen H. **Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging.** *Biol Reprod* 63:977-981.