

10
2ej.



UNAM-CCH

UNAM

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y
de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades**

**BASES IONICAS DE LOS CAMBIOS DE PERMEABILIDAD
INDUCIDOS POR EL SPERACT EN ESPERMATOZOIDES
DE ERIZO DE MAR.**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

presenta

Enrique Alejandro Reynaud Garza.

**Guanavaca-Mor
TESIS CON
FALLA DE ORFEN**

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas:

RA	Reacción acrosomal.
PFS	Polimero de fucosa sulfatada.
TEA*	Tetra etil amonio.
ADM	Agua de mar.
BCECF-AM	2-7-bis-5-(6)-carboxifluoresceina-acetometil ester.
diS-C ₃ -(5)	3-3-dipropiltiadicarbocianina (yoduro).
FCCP	Carbonil-cianida-trifluorometoxifenilhidrazona.
hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato.
DMSO	Dimetil sulfoxido.

INDICE.

Resumen:	1
I. Introducción y Antecedentes:	2
1. El erizo de mar.	2
2. El espermatozoide de Erizo de Mar.	2
3. La Activación del Espermatozoide.	2
4. La Reacción Acrosomal y la Respuesta del Espermatozoide a los Péptidos de la Gelatina.	3
5. La Reacción Acrosomal.	3
6. Flujos Iónicos durante la Reacción Acrosomal.	4
7. Efecto del Resact y del Speract sobre el Espermatozoide.	5
8. El espermatozoide Hinchado.	6
II. Objetivos:	7
III. Materiales y Métodos:	9
1. Erizos.	9
2. Medios.	9
3. Materiales y técnicas:	9
a. Reactivos.	9
b. Medidas.	10
c. Titulación del potencial de membrana.	10
d. Titulación del pH_i .	11
e. Determinación de la densidad de carga y del potencial de superficie.	14
IV. Resultados:	17
V. Discusión:	28
VI. Conclusiones.	30
VII. Bibliografía	31

Resumen:

El espermatozoide de erizo de mar responde fisiológicamente a los óvulos de su misma especie. Esta respuesta está mediada por factores difusibles que se encuentran en la capa externa del óvulo y que son capaces de inducir la reacción acrosomal (RA) y quimiotaxis.

El mecanismo molecular de estos dos fenómenos no se conoce bien, sin embargo, se sabe que en ellos ocurren cambios dramáticos en la permeabilidad de la membrana plasmática a K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y H^+ . Existe evidencia farmacológica de la importancia de los canales de Ca^{2+} y de K^+ puesto que bloqueadores de estos canales inhiben la RA.

Entre los factores difusibles del óvulo se encuentran el factor inductor de la reacción acrosomal, un polímero de fucosa sulfatada de muy alto peso molecular y una serie de péptidos pequeños como el speract, que aunque no está demostrado todavía, podría ser un agente quimiotáctico. Este péptido, a concentraciones $< 2.5 \mu M$ activa la respiración e induce una hiperpolarización dependiente de K^+ . A $25 \mu M$ causa un incremento en el pH intracelular (pH_i) y en los nucleótidos cíclicos. A concentraciones mayores ($100 \mu M$), además de lo anterior provoca una repolarización transitoria, que a concentraciones saturantes ($> 100 nM$), la repolarización se mantiene y se produce una depolarización neta dependiente de Ca^{2+} .

Los espermatozoides se pueden hinchar manteniendo la integridad de su membrana plasmática (esta ha sido medida mediante la técnica de exclusión de bromuro de etidio). Estos muestran cambios inducidos por el speract en el potencial de membrana, y en la concentración de Ca_i y pH_i . Los espermatozoides hinchados resultan ser un modelo práctico para hacer experimentos de electrofisiología (patch-clamp), ya que los espermatozoides normales son muy pequeños por lo que las probabilidades de lograr un sello son muy bajas. Sin embargo, para considerar este sistema como válido es indispensable comprobar que las respuestas de los espermatozoides hinchados sean similares a las de los espermatozoides no perturbados.

Para poder explicar fenómenos como la quimiotaxis y la reacción acrosomal es indispensable conocer como ocurren a nivel molecular y como se regulan los flujos iónicos a través de la membrana plasmática del espermatozoide.

En este trabajo hemos alterado las condiciones iónicas del medio con el propósito de diseccionar su papel en la respuesta del espermatozoide hinchado a concentraciones saturantes de speract. Nuestros resultados sugieren que la hiperpolarización inducida por este péptido puede activar un incremento en el pH_i y que la repolarización disparada por concentraciones mayores a $25 \mu M$ del péptido involucra una entrada de Na^+ por un transportador aún no identificado. Aparentemente esta repolarización es necesaria para la apertura (causada por concentraciones nM de speract) de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje, sensible a Zn^{2+} , regulado por Mg^{2+} que es responsable de la despolarización. Por otro lado, determinamos, de manera preliminar, la densidad de carga de la membrana de los espermatozoides hinchados, lo que nos da información sobre el potencial de superficie de estas células en distintas condiciones iónicas. Esta información, a largo plazo, puede ser muy útil para explicar el comportamiento de moléculas tales como canales y receptores que se encuentren en la superficie del espermatozoide.

I. Introducción y Antecedentes:

1. El erizo de mar.

El erizo de mar es un modelo tradicional de fecundación porque tiene grandes ventajas desde el punto de vista experimental. Es un organismo de fecundación externa, lo que permite tener un control sencillo de muchas variables, tiene sexos separados y produce una gran cantidad de gametos (el macho produce $\sim 10^{10}$ espermatozoides y la hembra $\sim 10^6$ huevos) lo que da acceso a una gran cantidad de material biológico. Además, los erizos son fáciles de mantener en el laboratorio por un periodo prolongado.

La fecundación es una estrategia muy conservada en los organismos de reproducción sexual por lo que muchos de los datos obtenidos en modelos de reproducción externa podrían ser generalizados a organismos de reproducción interna (i.e la existencia de canales iónicos en espermatozoides de erizo y de mamífero).

2. El espermatozoide de Erizo de Mar.

El espermatozoide de erizo de mar es una célula muy pequeña y muy especializada cuyo diámetro máximo en *Lytechinus pictus* es de $\sim 1.5\mu\text{m}$. Estructuralmente esta compuesto por un núcleo, una mitocondria, un flagelo y un gránulo acrosomal (derivado del aparato de Golgi [Longo y Anderson, 1969]).

El gránulo acrosomal contiene enzimas líticas como fosfolipasas, hialuronidasas y proteasas que son necesarias en la penetración de las capas externas del óvulo durante la fertilización [Vaquier, 1975]. En la región periacrosomal existe actina monomérica que se polimeriza de manera explosiva durante la RA formando el túbulo acrosomal el cual, con ayuda de las enzimas líticas, penetra las capas externas del óvulo [Tilney y S.Inoue, 1982; Tilney y cols, 1983].

El flagelo esta constituido por el axonema que esta recubierto de membrana plasmática y mide $\sim 30\mu\text{m}$ de largo.

3. La Activación del Espermatozoide.

En el semen el espermatozoide se encuentra en un estado de arresto metabólico. En estas condiciones, la célula se encuentra inmóvil, su mitocondria se encuentra en estado 4 de respiración (es decir, muy bajo consumo de oxígeno). En el semen de *Srongylocentrotus purpuratus* las concentraciones de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ son 27, 9.8 y 428 mM respectivamente (medidas por absorción atómica [Christen y Cols, 1983]), el pH es de 7.6 y hay una cantidad considerable de CO_2 que contribuye a la acidificación del medio (el pH del agua

de mar es de ~ 8). Esta acidificación y la alta concentración de K^+ contribuyen a la inhibición de la respiración y de la motilidad [Clapper y cols., 1985].

Cuando los espermatozoides son eyaculados en el agua de mar, se diluyen por lo que baja la concentración intracelular de CO_2 , sube el pH extracelular a 8 y baja la concentración de K^+ a 10 mM lo que causa hiperpolarización de la membrana celular que activa al intercambiador Na^+/H^+ alcalinizando el pH_i. Esto repercute en la activación de la respiración y la motilidad, ya que, el aumento en el pH_i causa entre otras cosas que la dineína que es muy dependiente del pH_i se active e hidrolize ATP con lo que se genera la energía necesaria para mover al flagelo. Además, el ADP producido estimula a la mitocondria incrementando la respiración [Gibbons, 1981].

El citoplasma se alcaliniza, al menos en parte por un intercambiador Na^+/H^+ sensible a potencial de membrana que se activa en estas condiciones [Lee y cols, 1983]. En membranas aisladas de flagelos se ha demostrado que este intercambiador aumenta el pH_i y que es sensible al potencial de membrana, ya que es inhibida por una despolarización [Lee, 1984].

Al parecer el control del pH_i no está dado por el intercambiador Na^+/H^+ sensible a potencial sino también por una bomba de Na^+/K^+ [Gatti y Christen, 1985].

4. La Reacción Acrosomal y la Respuesta del Espermatozoide a los Péptidos de la Gelatina.

La gelatina es la capa más externa del óvulo y es un complejo glicoprotéico cuya estructura y composición son específicas para cada especie. Entre sus constituyentes principales se encuentra un polímero de fucosa sulfatada que es el factor inductor de la reacción acrosomal, además, contiene una serie de péptidos como el speract en *S. purpuratus* y el resact en *Arbacia punctulata*. Se a demostrado que el resact es un agente quimiotáctico [Ward y Cols, 1985].

5. La Reacción Acrosomal.

La reacción acrosomal (RA) se lleva a cabo cuando el espermatozoide hace contacto con la capa externa del óvulo (gelatina). Esta reacción consiste en la fusión de la membrana del gránulo acrosomal con la membrana plasmática, liberándose enzimas líticas necesarias para la penetración del espermatozoide a través de las capas externas del óvulo. Por otro lado, durante este proceso, la actina monomérica que se encuentra en el espacio periacrosomal se polimeriza de manera explosiva, generando el túbulo acrosomal permitiendo así la fusión del espermatozoide con el óvulo. La reacción acrosomal es estrictamente necesaria para que haya fecundación en el erizo y otras muchas especies, incluyendo a los mamíferos.

La reacción acrosomal en el espermatozoide de erizo dura aproximadamente 20 segundos. Es inducida por un polímero de fucosa sulfatada (PFS) que se encuentra en la gelatina y tiene un peso molecular muy grande (varios millones de Daltons) siendo su posible receptor una proteína de 210 kDa [Trimer y cols, 1985].

Se ha reportado un canal aniónico que se encuentra en la fracción enriquecida de la proteína de 210 K Da este canal tiene una alta conductancia y no es dependiente de voltage [Morales, 1992]

El PFS provoca un aumento en el AMP_c y en el GMP_c [Garbers y Hardman, 1975; Kopf y Garbers, 1980], un incremento en el recambio de fosfoinosítidos [Domino y Cols, 1988] y una estimulación de una fosfolipasa D [Domino y Cols, 1989]; asimismo, induce cambios drásticos en la permeabilidad de la membrana plasmática a K⁺, Na⁺, H⁺ y Ca²⁺, los cuales son críticos para que se lleve a cabo la reacción acrosomal.

6. Flujos Iónicos durante la Reacción Acrosomal.

El PFS induce una entrada de Na⁺ y Ca²⁺, una salida de H⁺ y K⁺ [Segall y Lennarz 1981; Shackmany cols 1978], un aumento rápido y sostenido en el Ca_i, un aumento en el pH_i, (medidos mediante indicadores fluorescentes) y una despolarización de -36mV a 0mV. La RA se puede bloquear con agua de mar que tiene 30mM de KCl. También el TEA⁺ (tetraetilamonio) puede ser capaz de inhibir la RA y la alcalinización del citoplasma [Shackman y cols, 1978; González-Martínez y Darszon, 1987] pero no es capaz de bloquear la hiperpolarización causada por el speract en vesículas de flagelo [Lee, 1988]

La reacción acrosomal se puede inducir con ionóforos de Ca²⁺ como el A23187, en donde se observa la RA hay un aumento rápido del pH_i, del Ca_i y una despolarización; estas condiciones, al parecer, son suficientes para inducir la RA [Shapiro, 1986]. El aumento en el pH_i es indispensable para la RA, este puede inducirse mediante intercambiadores H⁺/cation monivalente como la nigericina o con amonio 15mM. Cuando se aumenta el pH_i artificialmente se puede inducir la RA aún en presencia de 30 mM de K⁺, si se agrega simultáneamente PFS [Guerrero y Darszon, 1990]. El aumento de Ca_i durante la RA es mediado por canales de Ca²⁺ ya que bloqueadores de este tipo de canales (como el Verapamil y las dihidropiridinas) inhiben la RA, la entrada de este catión y la despolarización [Shackman y Cols, 1978; Garcia-Soto y Darszon, 1985; Garcia-Soto y Cols, 1987].

Utilizando colorantes para medir los cambios de concentración de Ca_i, se ha visto que el incremento de este durante la RA es muy rápido (<10s.). El Ca²⁺ entra a la célula por dos vías La primera es muy selectiva a Ca²⁺ y se bloquea con dihidropiridinas. La segunda deja pasar Mn²⁺, no se bloquea con dihidropiridinas y no se inactiva por lo que causa despolarización [Guerrero y Darszon, 1989].

7. Efecto del Resact y del Speract sobre el Espermatozoide.

El resact aumenta el pH_i activando el intercambio Na⁺/H⁺, modula segundos mensajeros como son nucleótidos cíclicos y estimula a la guanilato ciclasa, la cual es desactivada más tarde al parecer por fosfatasa [Swarup y Garbers, 1982].

El resact (Cys-Val-Thr-Gli-Ala-Pro-Gli-Gli-Gli-Arg-Leu) se puede entrecruzar con la guanilato ciclasa de *Arbacia punctulata*, lo que sugiere algún tipo de interacción con ésta. La zona en el espermatozoide donde se encuentra la máxima actividad de esta enzima es en el flagelo [Mourelle y Cols., 1984]. En esta zona también se encuentran localizadas las fosfodiesterasas, sugiriendo una regulación muy fina de este tipo de mensajeros [Sano, 1976].

El speract es un péptido de 10 residuos de aminoácidos cuya secuencia es: Gli-Fen-Asp-Leu-Asn-Gli-Gli-Gli-Val-Gli que se encuentra en la gelatina de *S.purpuratus* [Hansbrough, y Garbers, 1981; Susuki y cols, 1981; Garbers y cols, 1982]. Se ha propuesto que una proteína glicosilada de 77 kDa es el receptor del speract [Dangott y Garbers 1984]. El speract tiene el mismo efecto que el resact sobre la guanilato ciclasa [Chovadarapu y Garbers, 1984]. Asimismo, es capaz de incrementar la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos y de aumentar la respiración; aún no se ha podido demostrar si tiene una función quimiotáctica [Garbers y Hardman, 1975, Hansborough y Garbers; Suzuki y cols., 1982]. Además, el speract modula la permeabilidad iónica de la membrana plasmática.

A concentraciones < 2.5 pM incrementa la permeabilidad de K⁺, la salida de este catión causa una hiperpolarización, a concentraciones >10 pM induce una repolarización transitoria y a >25 pM promueve el intercambio de Na⁺/H⁺ aumentando así el pH_i. Sin embargo, no están descartados otros mecanismos de alcalinización del pH_i. A concentraciones mayores > 25 nM causa una despolarización neta dependiente de Ca²⁺ extracelular [Lee y Garbers, 1986]. La variedad de respuestas que tiene el espermatozoide a un gradiente muy amplio de concentraciones de este péptido sin duda tiene que ver con señales involucradas en quimiotaxis o algún otro proceso importante en la fecundación.

La despolarización dependiente de Ca²⁺, el incremento en el pH_i y la respuesta al speract son inhibidos si se bloquea la hiperpolarización con 30 mM de K⁺ [González-Martínez y Darszon, 1987; Guerrero y Darszon, 1989]. Esto indica que la activación de canales de K⁺ es un evento inicial en la respuesta a este péptido.

El aumento en la concentración del GMP_c intracelular inducido por el speract, así como el hecho de que el receptor del resact pueda ser entrecruzado con una guanilato ciclasa, nos lleva a creer que este tipo de moléculas está involucradas en la transducción de señales mediante las cuales el

espermatozoide responde al speract. Se ha observado que la inhibición de las fosfodiesterasas prolongan la entrada de Ca^{2+} [Shackman y Chock, 1988].

La guanilato ciclasa de *S. purpuratus* tiene homología con otras tirosin-cinasas [Singh y cols, 1988], lo que sugiere que algunos canales de esta célula podrían ser modulados según su grado de fosforilación.

8. El espermatozoide Hinchado.

El espermatozoide normal es una célula muy pequeña a la que es muy difícil hacer registros electrofisiológicos. Esta célula se puede hinchar por un choque hipoosmótico con agua de mar diluida 1:10 a la que se le ha agregado 20mM como concentración final de MgSO_4 [Babcock y cols, 1990]. Se ha demostrado mediante una tinción fluorescente con bromuro de etidio, que en estas condiciones la integridad de la membrana plasmática de la célula se mantiene intacta, la mitocondria también se mantiene energizada, manteniendo la homeostasis en cuanto a pH_i , potencial de membrana y Ca_i , adquieren una topología esférica ($\sim 4\mu\text{m}$ de diámetro), el axonema se internaliza y quedan inmóviles. Estas características permiten aumentar la probabilidad de éxito unas 10 veces al intentar hacerles registros electrofisiológicos utilizando la técnica de "patch clamp", además, son capaces de responder al speract y sus señales son más grandes, más lentas y difieren poco de las de el espermatozoide normal.

En condiciones saturantes de speract ($>10^{-7}\text{M}$) hay una entrada de Ca^{2+} . Otros cationes divalentes como el Sr^{2+} , el Ba^{2+} y el Mn^{2+} también pueden entrar. Además el pH_i del espermatozoide aumenta ~ 0.4 unidades de pH y luego se estabiliza, mientras que la membrana plasmática sufre una hiperpolarización seguida de una repolarización y finalmente se despolariza.

En concentraciones medias (10^{-9}M) la despolarización no se observa y no hay aumento en el Ca_i , sin embargo, se mantienen la hiperpolarización, la repolarización y el aumento en el pH_i .

A concentraciones bajas (10^{-12}M) sólo se observa el aumento en el pH_i y una hiperpolarización debida al flujo de K^+ . El flujo de K^+ a través de canales específicos puede demostrarse bloqueandolos con TEA^+ en el medio extracelular e invirtiendo el gradiente electroquímico de este catión, de manera que su flujo se invierte (ahora es de afuera hacia adentro de la célula), este flujo es parcialmente bloqueado y no se alcanza la despolarización esperada. El TEA^+ aplicado en el medio extracelular es incapaz de bloquear la salida de K^+ , sin embargo, en estas condiciones es capaz de evitar parcialmente la entrada de este catión [Babcock y Cols, 1992].

Toda esta información permite formular modelos muy burdos del mecanismo de acción de estos péptidos que posiblemente pudieran explicar fenómenos macroscópicos tan importantes como la quimiotaxis y los eventos preparativos para la reacción acrosomal y la fecundación. Uno de estos modelos podría ser el siguiente:

La activación de canales de K^+ genera una hiperpolarización que probablemente remueve la inactivación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, abre canales de Na^+ y activa el intercambio de Na^+/H^+ aumentando así el pH_i . La entrada de Na^+ causa una repolarización que activa canales de Ca^{2+} y la entrada de este catión produce una depolarización neta y el aumento en el Ca_i . Se ha demostrado que existen en el flagelo de erizo de mar al menos dos sensores de Ca^{2+} , uno de alta afinidad que responde a 10^{-7} M de Ca^{2+} y otro de afinidad mas baja ($>10^{-6}$ M), que son capaces de modular la frecuencia y la simetría de las ondas de flexión del flagelo, [Brokaw, 1991]. La entrada regulada de Ca^{2+} a la célula seguramente modifica la dirección y la velocidad con la que el espermatozoide nada.

El aumento en el Ca_i y en el pH_i , causado por el intercambiador de Na^+/H^+ , permite que la dineína se active, estimulando la motilidad del flagelo, lo que podría redundar en quimiotaxis.

Por otro lado, es importante estudiar las diferencias en las respuestas al speract entre los espermatozoides normales y los hinchados para validar el uso de estos últimos como modelo en futuros experimentos de "patch clamp".

II. Objetivos:

El objetivo general de este trabajo es diseccionar mediante la sustitución de iones la secuencia de flujos iónicos y su influencia durante la respuesta del espermatozoide hinchado de *S. purpuratus* a concentraciones saturantes de speract.

Se utilizaron concentraciones saturantes de speract por dos razones:

1) Esto es lo que ve el espermatozoide al entrar en contacto con la capa externa del óvulo, justo antes de sufrir la RA.

2) Cuando la concentración de speract es saturante (>100 nM) y los espermatozoides se encuentran en buen estado la forma de la respuesta no cambia (a concentraciones menores la sensibilidad y la magnitud de la respuesta varía de lote a lote, Fig. 3), por lo que utilizar concentraciones altas garantiza la reproducibilidad de los experimentos.

Los objetivos particulares son los siguientes:

a) Establecer las condiciones ideales para medir simultáneamente los cambios de potencial de membrana y pH_i durante la respuesta del espermatozoide hinchado a condiciones saturantes de speract.

b) Medir el potencial de reposo de la membrana del espermatozoide hinchado y sin hinchar, en condiciones depletadas de algún ión o iones (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cl^- substituídos por iones impermeables a la membrana).

c) Caracterizar el efecto de la substitución de algún o algunos iones en la respuesta del espermatozoide a concentraciones saturantes de speract.

d) Observar el efecto de distintas concentraciones de Zn^{2+} sobre la respuesta del espermatozoide al speract.

e) Medir la densidad de carga de la membrana citoplásmica del espermatozoide de erizo de mar hinchado.

f) Comparar la respuesta al speract de los espermatozoides hinchados y los no hinchados.

g) Utilizar la información obtenida para proponer un modelo de los eventos moleculares durante la respuesta al speract.

III. Materiales y Métodos:

1. Erizos.

Los erizos *S. purpuratus* se obtuvieron de Pacific Biomarine Laboratories (4134 del Rey Ave. Venice Ca.).

La eyacuación se indujo con una inyección intra-celómica de KCl 0.5M. Los espermatozoides se colectaron "secos" (sin diluir) con una pipeta pasteur, mantenidos en hielo y utilizados el mismo día.

2. Medios.

El agua artificial de mar completa (ADM) contenía: NaCl 486mM, MgCl₂ 26mM, MgSO₄ 30mM, CaCl₂ 10mM, KCl 10mM, NaHCO₃ 2.5mM, EDTA 0.1mM, HEPES 10mM pH 8.

El agua artificial de mar diluída consistía en ADM diluida diez veces suplementada con MgSO₄ hasta una concentración final de 20mM a pH 6.8 (cuya osmolaridad es de 120 a 160 mOSM) [Babcock y Cols, 1992].

En los casos en que se substituyeron cationes, la osmolaridad se compensó de manera aproximada con cloruro de colina, agregando la concentración molar final (de cloruro de colina) de la sal del catión o cationes substituidos, sin importar si estos eran mono o divalentes (ver Figuras y Tabla1).

El Cl⁻ se substituyó por ácido metano-sulfónico titulado con el hidróxido de cada uno de los cationes que constituyen al agua de mar. Cuando se substitúan simultáneamente al Cl⁻ y al Na⁺, el ácido metano-sulfónico (anión) se tituló con n-metil- glucamina (catión). La membrana plasmática es impermeable al ácido metano sulfónico y a la n-metil-glucamina.

3. Materiales y técnicas:

a. Reactivos.

El speract que se utilizo, es un péptido sintético que se obtuvo de Peninsula Laboratories (611 Taylor Way, Belmont California 94002-4041 U.S.A.).

El 2-7-bis-(2-carboxietil)-5-(-6-)-carboxifluoresceína-acetometil-ester (BCECF-AM) (sensible a pH) y la 3,3-dipropiltiadicarbocianina (yoduro) (diS-C₃-(5)) (sensible a potencial de membrana) se obtuvieron de Molecular Probes. La valinomicina y el desacoplante FCCP se compraron de Sigma.

Todos los demás compuestos fueron de la máxima calidad disponible comercialmente.

b. Medidas.

Las medidas se hicieron a 15°C en un microfluorímetro *Hansatech* de cámara redonda con 5 ventanas (ver Esquema 1), por lo que se pueden hacer medidas simultáneas de pH_i y de potencial de membrana (cuyas longitudes de excitación y emisión no interfieren unas con otras porque sus picos de excitación y de emisión no se sobrelapan. Los experimentos se han hecho en ausencia de alguno de los fluoróforos y los resultados han sido similares).

La fuente de luz que se utilizó fue una lámpara *Schott KI 1500 Electronic* equipada con dos fibras ópticas. La luz se filtró con filtros de interferencia que sólo permiten el paso de un rango de longitudes de onda muy cercano al pico de excitación de el diS-C₃-(5) (630 nm) y del BCECF-AM (505 nm).

La señal de cada uno de los fluoróforos se captó por fotodiodos independientes equipados con filtros de interferencia, los cuales sólo dejan pasar un rango de luz con una longitud de onda muy cercano a la de emisión de el diS-C₃-(5) (670 nm) y del BCECF-AM (535). Las señales se amplificaron con dos amplificadores *Hansatech* y se registraron con un registrador de dos canales *Kipp & Zonnen*.

Todos los experimentos excepto los de potencial de superficie se hicieron en presencia de desacoplante.

El pH se midió con un potenciómetro *Beckman* $\Phi 45$ y un electrodo *Orion* 8103.

c. Titulación del potencial de membrana.

Las medidas de potencial de membrana se llevaron a cabo utilizando el colorante fluorescente diS-C₃-(5) (2 μ M) que tiene carga positiva y es sensible a potencial de membrana. Este fluoróforo es un molécula anfifílica cuyo coeficiente de partición entre la membrana y el medio extracelular cambia según el potencial eléctrico de la célula (tiende a entrar cuando la célula se vuelve mas negativa y a salir cuando esta se despolariza) y la intensidad de su fluorescencia baja cuando se encuentra dentro de la célula. lo anterior se debe a que cuando la concentración intracelular de este fluoróforo aumenta se acompleja consigo mismo en trímeros cambiando sus propiedades de absorción lo que lleva a una disminución en la fluorescencia [Cabrini y cols, 1986]. Esta técnica mide los cambios de fluorescencia se relacionan con el potencial de membrana [González-Martínez y Darszon, 1987].

El ensayo se hizo en una cubeta redonda que contenía 700 μ l del ADM correspondiente y 2 μ M de diS-C₃-(5) (agregado de una solución stock: 1mM en DMSO) a la que se le adicionaron 25 μ l de semen diluido 1:10 en ADM con CaCl₂ 1mM pH 7 (en los casos en los que se midió el potencial de membrana substituyendo algún ión o iones, el semen se resuspendió en el medio correspondiente). Los espermatozoides se incubaron con agitación hasta obtener una señal estable (~ 5min.) y se trataron con 1 μ M de desacoplante, para colapsar el potencial mitocondrial, dejando así al potencial de membrana como

el principal componente de la señal del fluoróforo. Una vez que la señal se estabiliza se agrega valinomicina a una concentración final de 360nM (agregado de una solución stock: 25µM en DMSO), lo que vuelve permeable a la membrana plasmática a K⁺. En estas condiciones se agregaron concentraciones crecientes de KCl.

La calibración se hizo midiendo el porcentaje de cambio en fluorescencia: $\Delta\%F = \frac{F-F_0}{F_0} \times 100$ donde, F₀ = Fluorescencia del medio con espermatozoides mas desacoplante y F = Fluorescencia inducida por cambios en la concentración de K⁺ en presencia de valinomicina.

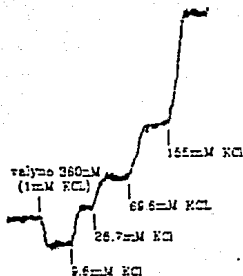
Estos datos se graficaron contra el potencial de Nernst: $V_{m_{ion}} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[ion]_i}{[ion]_e}$ para las distintas concentraciones de K⁺ (asumiendo que la [K⁺]_e = 180 mM). En estas gráficas el potencial de reposo está definido como el punto donde esta recta intersecta al eje de las X (cuando la concentración extracelular de K⁺ alcanza al potencial de reposo no hay cambio en la fluorescencia al agregar valinomicina, esto se llama Null point o potencial de inversión) (ver Tabla 1 y Figura 1).

d. Titulación del pH_i.

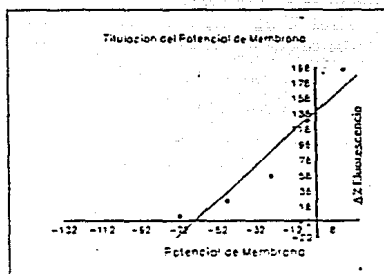
El pH_i se midió con el colorante fluorescente sensible a pH BCECF-AM. Los espermatozoides se diluyeron 1:10 con ADM que contenía CaCl₂ 1mM, pH 7 y finalmente se les agregó 10µM de BCECF- AM (1mM diluido en DMSO sol.stock) y se incubaron toda la noche a 4°C, lavados en 10 volúmenes del mismo medio y centrifugados a 3000 rpm en un rotor JA20 por 7min. Se decantaron y la pastilla fue resuspendida en el medio de interés [Guerrero y Darszon 1989]. El BCECF- AM en su forma esterificada no esta cargado y es permeable a la membrana plasmática, una vez que penetra en las células las esterasas intracelulares lo desesterifican con lo que adquiere carga, se vuelve impermeable, fluorescente y su fluorescencia es dependiente de pH. Se agregaron 25µl de los espermatozoides así preparados a una celda redonda con 700µl del medio de interés, si la medida era simultánea también contenía diS-C₃-5.

El pH_i se calibró una vez hechos los experimentos pertinentes, permeabilizando a la membrana plasmática con Triton X-100 al 0.01% y midiendo el pH del medio con un potenciómetro. Después se agregaron distintas cantidades de NaOH 0.1N o HCl 0.1N, registrando los cambios de fluorescencia y pH. Se graficó después el cambio en las UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia) contra el pH. El rango lineal de esta curva se encontraba entre pH 6.2 y 8. [Guerrero y Darszon, 1989].

a.



b.



c.

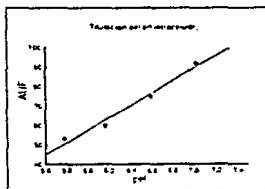
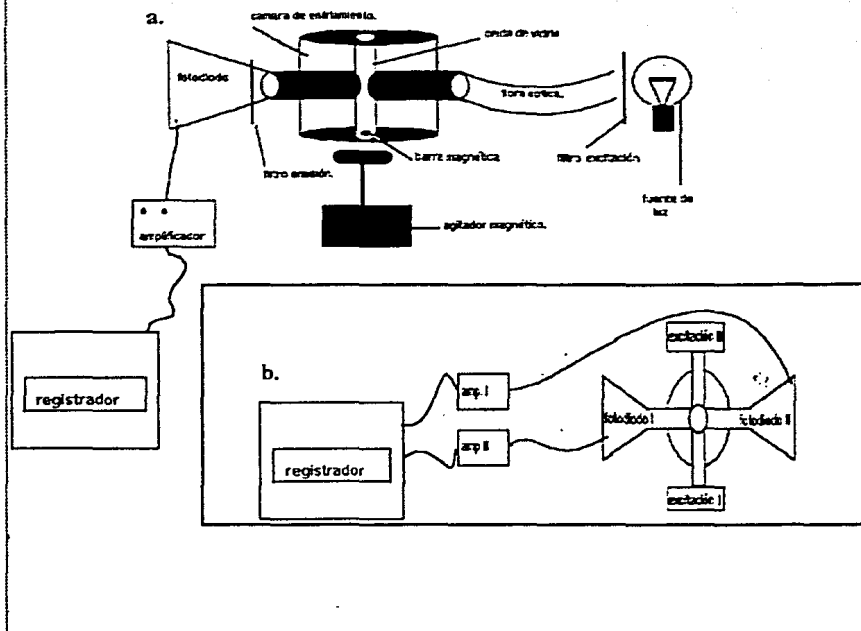


Fig. 1. Titulación del Potencial de Membrana.

a) Ejemplo de una curva de titulación para el potencial de membrana de espermatozoides hinchados utilizando diS-C₃-(5) y valinomicina, las flechas indican las adiciones de KCl. b) Grafica de la información obtenida en "a" (la linea es una regresión lineal) contra el potencial de Nernst para las diferentes concentraciones de K⁺ extracelular asumiendo que la concentración intracelular para este catión es 180 mM. c) Curva de titulación de pH_i.

Fluorómetro Hansatech.



Esquema 1. Representación esquemática del micro fluorómetro Hansatech utilizado en los experimentos descritos.

a) Vista lateral del aparato. b) Vista superior del aparato.

e. Determinación de la densidad de carga y del potencial de superficie.

La densidad de carga de la membrana plasmática de los espermatozoides hinchados se calculó utilizando el método de desplazamiento de 9-amino-acridina por cationes divalentes (Mg^{2+}) y monovalentes (K^+) [Chow y Barber, 1980]. Este ensayo se realiza de la siguiente manera: a 2ml de ADM diluida libre de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH 6.8 y $10\mu M$ de 9-amino-acridina se le mide la fluorescencia basal y se agregan $60\mu l$ de una dilución 1:10 de semen, se vuelve a medir la fluorescencia 1min después y se calcula el $\Delta\%F$. La 9-amino-acridina deja de fluorescer cuando interactúa con la superficie cargada de la membrana plasmática (estas medidas se hicieron en un fluorómetro *Perkin-Elmer LS-3*).

Este procedimiento se repite varias veces en distintas concentraciones de cationes divalentes y monovalentes, los resultados se grafican: $\Delta\%F$ versus la concentración de ambos cationes. De esta gráfica se extrapolan los valores de las concentraciones de los dos cationes a un $\Delta\%F$ (Figura 2) y estos se substituyen en la ecuación de Chow-Barber [Chow barber, 1980]:

$$\sigma = - \left[2RT\varepsilon_x\varepsilon_0 \left(C' - 4C'C'' \right) + C'' \right]^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

C' =[catión monovalente]

C'' =[catión divalente]

σ = densidad de carga

R = Constante de los gases

T =Temperatura °K

ε_x = Constante dieléctrica del medio

ε_0 =Constante dieléctrica del vacío

U =Coulombs/ m^2

La densidad de carga se substituye en las siguientes ecuaciones:
para un solo catión se utiliza la ecuación de Guy-Chapman:

$$\sinh \frac{ZF\Psi_0}{2RT} = - \frac{136\sigma}{\sqrt{C}}$$

Donde:

σ =(coulomb/ m^2)/16=cargas/ Å^2

C =[catión] M

Z =valencia

$F/RT=0.03952 V^{-1}$

Ψ =potencial de superficie

de donde se despeja Ψ :

$$\Psi = \frac{\operatorname{senh}^{-1}\left(\frac{134.6\sigma}{\sqrt{\epsilon}}\right) 51.38}{Z}$$

para una mezcla de cationes mono y divalentes se utiliza la ecuación de Graham [McLaughlin, 1989]:

$$\sigma = \left[\sum_i C_i \left(\operatorname{Exp} \frac{-Z_i F \Psi_0}{RT} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

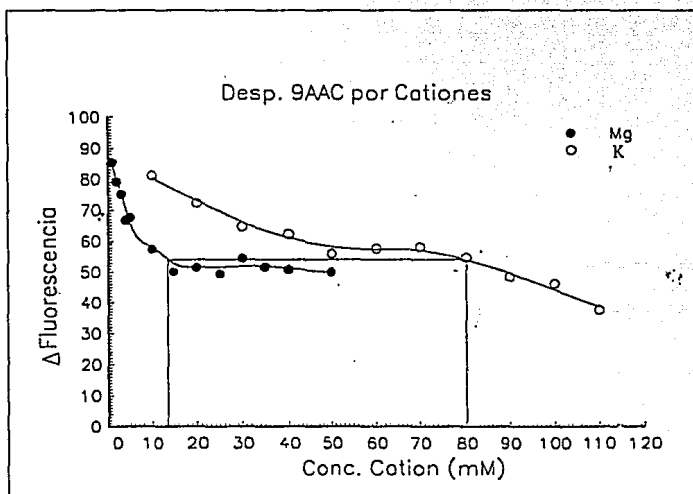


Fig. 2. Gráfica del desplazamiento de la 9AAC por cationes.

En esta gráfica se puede ver la forma como es desplazada la 9AAC por cationes monovalente (K^+) y divalentes (Mg^{2+}) y la extrapolación para utilizar los valores en la ecuación de Chow-Barber (estos experimentos se hicieron por triplicado).

IV. Resultados:

La manera más sencilla de observar cual es la función de un componente en un sistema complejo, es quitarlo y analizar la repercusión de su remoción en el sistema.

En el caso del espermatozoide de erizo de mar es relativamente fácil substituir en cualquier porcentaje a cualquier catión o cationes del ADM con colina (cloruro) y a los aniones con ácido metano-sulfónico.

a) Respuesta normal del Espermatozoide hinchado al Speract.

En la Figura 4a, podemos ver la respuesta característica al speract (en concentraciones saturantes) de los espermatozoides hinchados de erizo de mar (de acuerdo con lo reportado por Babcock y cols, 1992). Este es un registro simultáneo de potencial de membrana (trazo superior) y de pH_i (trazo inferior). En este registro podemos observar que al poner en contacto a los espermatozoides con el speract se induce una hiperpolarización e inmediatamente después una repolarización seguida de una despolarización neta final (algunos lotes de espermatozoides se mantienen despolarizados mientras que otros después de despolarizarse se hiperpolarizan lentamente). De manera simultánea a la hiperpolarización el pH_i se alcaliniza ~ 0.4 U de pH y después se estabiliza.

b) Experimentos de sustitución de Na^+ :

Si sustituímos el Na^+ extracelular por colina podemos observar, como se muestra en la Figura 4b, que la hiperpolarización se mantiene. La hiperpolarización esta mediada por la salida de K^+ , si se agrega este catión (en estas condiciones) después de agregar speract se produce inmediatamente una despolarización demostrando una permeabilidad a K^+ . Sin embargo, la repolarización y la alcalinización del medio intracelular se inhiben en ausencia de Na^+ . En estas condiciones el pH_i se acidifica muy lentamente.

c) Experimentos de sustitución de Ca^{2+} :

Cuando el medio es depletado de Ca^{2+} (Fig.4c), ni el aumento en el pH_i ni la hiperpolarización inicial se ven afectadas, sin embargo, parte de la repolarización y toda la despolarización son inhibidas. Este resultado también se puede obtener si se incuban los espermatozoides con $3\mu M$ de Zn^{2+} , que es un bloqueador inespecifico de canales de Ca^{2+} [Farach y cols, 1987; Hirschie y Epel, 1983; Clapper y cols, 1985] (El efecto de distintas concentraciones de Zn^{2+} se puede ver en la Figura 7.).

El aumento en el pH_i no se afecta en ausencia de Ca^{2+} , esto apunta a que la alcalinización del citoplasma es independiente de la entrada de Ca^{2+} .

d) Experimentos de sustitución del Mg^{2+} :

En el espermatozoide de erizo de mar el Mg^{2+} juega un papel regulatorio importantísimo, como se muestra en la Fig.4d. En ella podemos observar que el tamaño de la hiperpolarización parece ser mas pequeña y la despolarización mas grande que en el control.

Por otro lado el aumento en el pH_i se mantiene normal, descartándose así la participación del Mg^{2+} en este proceso.

e) Dependencia de Na^+ extracelular durante la respuesta al speract:

La necesidad de la existencia de una cantidad mínima de Na^+ extracelular es evidente en la Fig. 5, en la que se puede ver como en condiciones depletadas de este ión que el pH_i no sólo no se alcaliniza sino que se acidifica lentamente. Esto, probablemente se deba a una inversión del gradiente de Na^+ con la consecuente inversión del funcionamiento del intercambio Na^+/H^+ , además, como se indica en la Fig.4b, se puede ver que, la célula se mantiene hiperpolarizada cuando la concentración de Na^+ es muy baja, sin embargo, conforme la concentración extracelular de Na^+ aumenta, la magnitud de la alcalinización del pH_i también aumenta y al parecer lo hace de una manera bastante lineal, estabilizándose alrededor de 0.4 U de pH (de $pH \sim 6.8$ a ~ 7.2). Cuando la concentración extracelular de Na^+ alcanza a ser de aproximadamente 40mM, la alcalinización alcanza su máximo (0.4U de pH). En todas las concentraciones de Na^+ la alcalinización, aparece simultáneamente con la repolarización del potencial de membrana, lo que sugiere que tanto el aumento en el pH_i (dependiente del intercambio H^+/Na^+) como la repolarización (que posiblemente sea dependiente de un canal de Na^+) son mediados por una entrada de Na^+ .

f) Importancia de las especies iónicas y su concentración extracelular en el potencial de membrana:

Determinar el potencial de reposo de una célula es importante porque muchas de las moléculas que se encuentran embebidas dentro de la membrana plasmática (canales y receptores) son reguladas o influidas por el potencial de membrana. Además, la dirección de los flujos de distintos iones durante una eventual apertura de una conductancia a través de la membrana también está determinada por el potencial de reposo de la célula.

El potencial de reposo de los espermatozoides de erizo depende de manera muy importante de las condiciones iónicas del medio en el que se encuentra. En la Tabla 1, se puede observar que el potencial de reposo del espermatozoide, esté hinchado o no, depende de la concentración extracelular de cationes existentes en el ADM (en este caso: Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). Un aumento en la concentración extracelular de estos cationes hace que el potencial de reposo de la célula sea mas positivo siempre y cuando exista una permeabilidad. El caso del K^+ es una excepción ya que su gradiente electroquímico causa una hiperpolarización cuando se abre una permeabilidad. El simple hecho de

remover al Na^+ y al Ca^{2+} causa que la célula se hiperpolarize de una manera apreciable, (este resultado es significativo según la prueba de "t" hasta un 0.05%) esto indica que probablemente existan permeabilidades basales a estos cationes.

Los dos cationes con mayor efecto sobre el potencial de reposo de los espermatozoides son en orden de influencia el Mg^{2+} y el Na^+ . El Mg^{2+} es el segundo catión más importante (en cuanto a concentración) en el ADM, además, en algunos casos es capaz de regular directamente algunos canales presentes en la membrana citoplásmica. El hecho de que sea el catión divalente más abundante en este sistema, hace que, sea el que más influye en el potencial de superficie de estas células, por lo que también puede regular de manera indirecta a otros tipos de canales (las concentraciones locales de iones cambian dramáticamente dependiendo del potencial de superficie, también afecta a la conformación de moléculas que se encuentran en la superficie de la membrana e influye en fenómenos de gating). El Na^+ es el principal catión del ADM, su influencia también es muy notoria pero, al no ser divalente su efecto sobre el potencial de superficie es un poco menor que el de Mg^{2+} y como al parecer no regula nada en condiciones basales el efecto de la sustitución de este catión es menor que cuando se sustituye al Mg^{2+} . Cuando depletamos al medio extracelular de más de un catión, vemos que el efecto en el potencial de reposo es apreciable, sin embargo, no es aditivo.

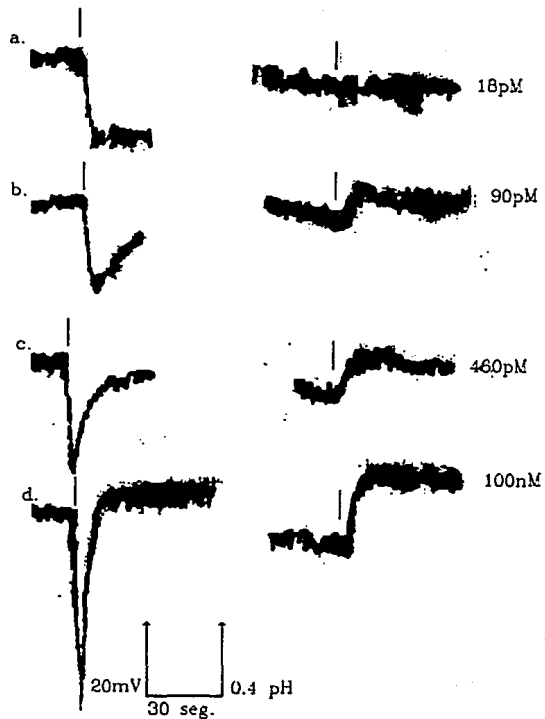


Fig.3. Curva de respuesta a distintas concentraciones de speract de los espermatozoides hinchados.

a) 18 pM speract. b) 90 pM speract. c) 460 pM speract. d) 100 nM speract. Las medidas fueron hechas simultáneamente, los trazos de la derecha son de potencial de membrana; los trazos de la izquierda son de pH_i , las barras indican el momento en que se agregó el speract (todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado).

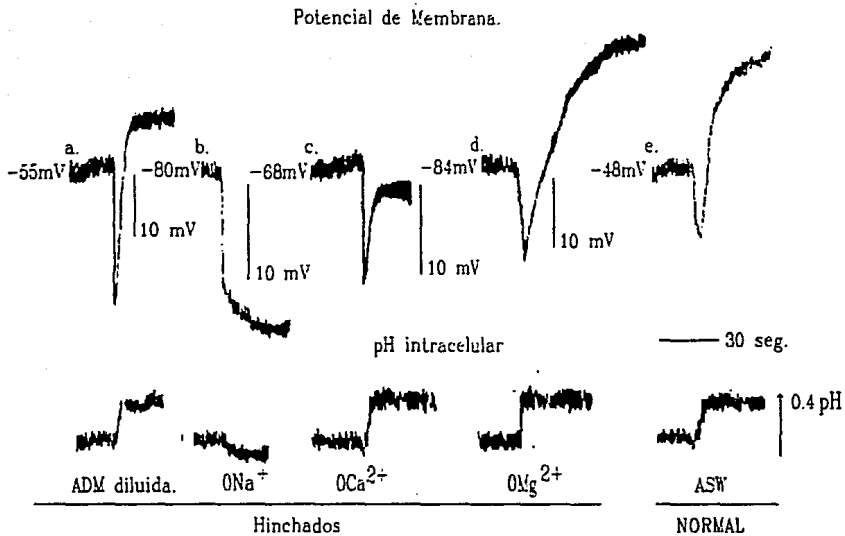


Fig. 4. Dependencia ionica de la respuesta de espermatozoides hinchados de *S. purpuratus*.

Los cationes fueron substituidos por cloruro de colina como está descrito en Materiales y Métodos. a) Respuesta normal de los espermatozoides hinchados a concentraciones saturantes de speract (130 nM). b) En la ausencia de Na^+ la repolarización y la alcalinización del pH_i se bloquearon. c) Cuando el Ca^{2+} fue substituido, la despolarización neta se bloqueó pero la repolarización y la alcalinización se mantuvieron. d) La substitución del Mg^{2+} causó un cambio en la cinética y en la forma de la respuesta del potencial de membrana, de cualquier manera, la alcalinización no se vió afectada. e) Respuesta de los espermatozoides normales a concentraciones saturantes de speract.

Todos los experimentos fueron hechos al menos por triplicado.

Las barras de calibración del potencial de membrana muestran la equivalencia entre cambio de fluorescencia y mV para cada condición.

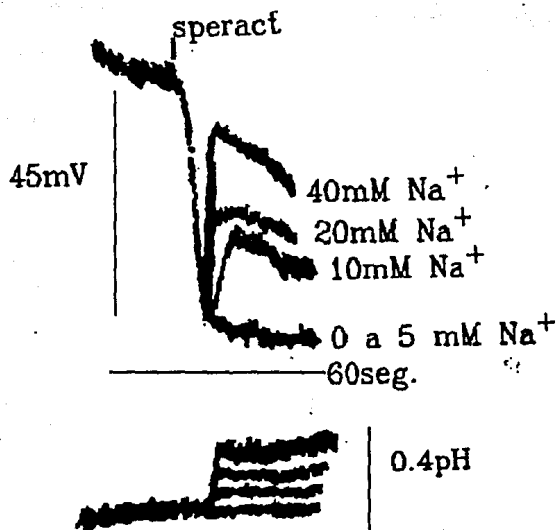


fig.5. Dependencia de la repolarización del potencial de membrana y el cambio de pH_i inducidos por el speract a Na^+ .

Potencial de reposo de la membrana del espermatozoide de erizo de mar en distintas condiciones ionicas

Hinchados:

Normales	0Na ⁺	0Ca ²⁺	0Mg ²⁺	0Na ⁺ 0Ca ²⁺	0Na ⁺ 0Mg ²⁺	0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺	0Na ⁺ 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺
-55±7mV	-80±9mV	-68±7mV	-84±10mV	-71±7mV	-81±5mV	-81±2mV	-78±2.5mV
n=7	n=4	n=4	n=7	n=4	n=10	n=5	n=4

Completos:

Normales	0Na ⁺
-48±6.5mV	-65±3mV
n=9	n=7

0Na ⁺ 0Mg ²⁺
-58±4mV
n=6

0Na ⁺ 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺
-69±1.5mV
n=5

Potencial de reposo de la membrana del espermatozoide de erizo de mar en distintas condiciones ionicas

Hinchados:

Normales	0Na ⁺	0Ca ²⁺	0Mg ²⁺	0Na ⁺ 0Ca ²⁺	0Na ⁺ 0Mg ²⁺	0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺	0Na ⁺ 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺
-55±7mV	-80±9mV	-68±7mV	-84±10mV	-71±7mV	-81±5mV	-81±2mV	-78±2.5mV
n=7	n=4	n=4	n=7	n=4	n=10	n=5	n=4

Completos:

Normales	0Na ⁺
-48±6.5mV	-65±3mV
n=9	n=7

0Na ⁺ 0Mg ²⁺
-58±4mV
n=6

0Na ⁺ 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺
-69±1.5mV
n=5

g) Experimentos de sustitución de Cl⁻

El Cl⁻ es, con mucho, el anión más importante del agua de mar, para fines prácticos es casi el único anión (seguido muy lejos por el SO₄⁻²) y su concentración es casi tan alta como la de todos los cationes juntos.

Nuestros experimentos demuestran que existe al menos un transporte electrogénico de Cl⁻ en la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar. Este transporte probablemente es dependiente de voltaje y se activa cuando la membrana plasmática se hiperpolariza (esto podría sugerir que existe un canal aniónico dependiente de voltaje). En la Fig.6a podemos ver que la respuesta del espermatozoide al speract en ausencia de Cl⁻ se parece mucho a la respuesta en presencia de este anión, sin embargo, la despolarización es extraordinariamente grande, esta despolarización no se bloquea por Zn²⁺ (datos no mostrados), lo que significa que no se debe sólo a una entrada de Ca²⁺. asumiendo, que la concentración intracelular de este anión es de 200 mM (Darszon y cols, datos no publicados) el potencial de Nernst para Cl⁻ en condiciones fisiológicas (600 mM extracelular) es de ~ -27 mV. En las células hinchadas es de ~ -30mV. Por lo tanto la salida de este anión es favorable tanto en condiciones fisiológicas como cuando se encuentra hiperpolarizado por la dilución de ADM o la sustitución de otros cationes, porque el potencial de reposo de la célula siempre es más negativo. Cuando se sustituye el Cl⁻ esta tendencia es favorecida aun más, el potencial de Cl⁻ en un medio depletado de este anión es de ~ -129 mV (a 1 mM de Cl⁻ extracelular). El potencial de reposo de la célula en esta condiciones es de ~ -35mV lo cual explica la depolarización observada si se abre un canal de Cl⁻. Cuando se hacen estos experimentos en ausencia de Cl⁻ y Na⁺ (fig.6b) se observa una hiperpolarización bastante grande que se mantiene unos segundos y después una repolarización muy lenta que se acelera muy rápidamente y que se estabiliza cerca del potencial de reposo de la célula. La magnitud aparente de la señal de la hiperpolarización probablemente se deba a que no existe ningún ión que enmascare el tamaño real de la hiperpolarización de la membrana. Alternativamente, se podría deber a un cambio en el rendimiento cuántico del fluoróforo (no se han hecho los controles correspondientes). De cualquier manera, la información real de este experimento se encuentra en el cambio de la relación entre la hiperpolarización y la despolarización. Cuando estos experimentos se repiten en ausencia de Cl⁻ y Ca²⁺ (Fig.6c), la repolarización es más lenta y la despolarización es menor pero todavía está presente, indicándonos que hay un flujo de Cl⁻ y que un componente de la despolarización observada en los otros trazos no se debe a la entrada de Ca²⁺ sino a la salida de Cl⁻. Si hacemos este experimento en ausencia de Cl⁻, Na⁺, Ca²⁺, (Fig.6d) podemos observar que no habiendo ningún catión extracelular que pueda repolarizar a la célula, esta sufre una repolarización lenta pero evidente que se estabiliza cerca del potencial de reposo. Esta es otra evidencia que nos indica la posible apertura de canales de Cl⁻.

h) Determinación de la densidad de carga y del potencial de superficie en los espermatozoides hinchados.

La densidad de carga de una membrana plasmática se define como carga eléctrica por unidad de área, comunmente, Coulombs/m². Conociendo este valor para una membrana dada se puede calcular el potencial de superficie para cualquier mezcla de cationes divalentes y monovalentes (como ya se discutió en Materiales y Métodos). El potencial de superficie influye de manera importante en el comportamiento de algunos canales iónicos

La densidad de carga del espermatozoide hinchado resultó ser de ~ 0.035 C/m² el cual es un valor alto pero no descabellado [Cerbón y Calderón, 1990]. Dicho valor nos indica que el potencial de superficie de los espermatozoides hinchados en ADM que contiene la concentración normal de cationes divalentes (27 mM) es de ~ -26mV y cuando se depleta de estos es de ~ -46mV este cambio por sí sólo, puede afectar dramáticamente el comportamiento de los canales dependientes de voltage (fenómenos de gating, y alterando las concentraciones locales de iones) y la interacción de receptores con sus respectivos efectores (fenómenos de repulsión y atracción electrostática).

i) Efecto de concentraciones μM de Zn^{2+} .

El Zn^{2+} a concentraciones muy bajas (<7 μM) bloquea completamente a la despolarización neta causada por concentraciones saturantes de speract. En la Figura 7 se puede observar que el efecto es dependiente de la dosis y que a estas concentraciones el Zn^{2+} no afecta al aumento en el pH_i ni a ningun otro efecto del speract en el potencial de membrana.

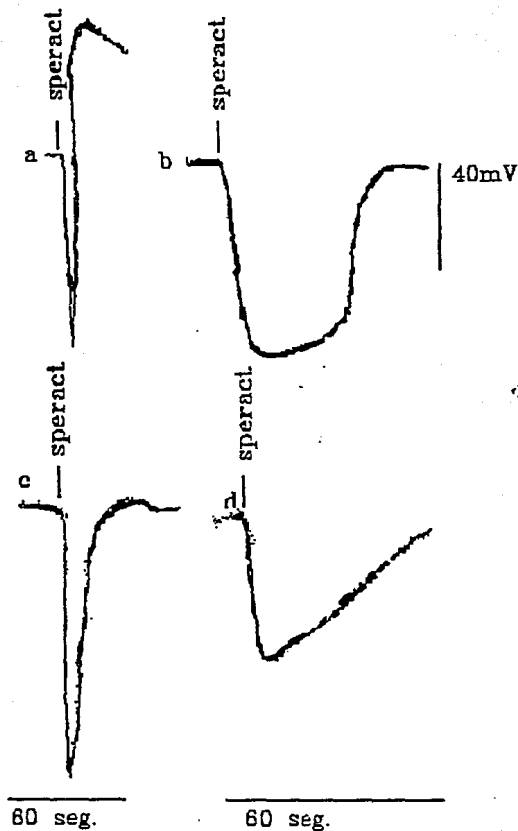


Fig. 6. Respuesta del potencial de membrana de los espermatozoides hinchados en ausencia de Cl^- extracelular.

a) Depletados de Cl^- . b) Depletados de Cl^- y de Na^+ . c) Depletados de Cl^- y de Ca^{2+} . d) Depletados de Cl^- , Na^+ , y Ca^{2+} . Las barras inferiores indican una escala diferente de tiempo. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

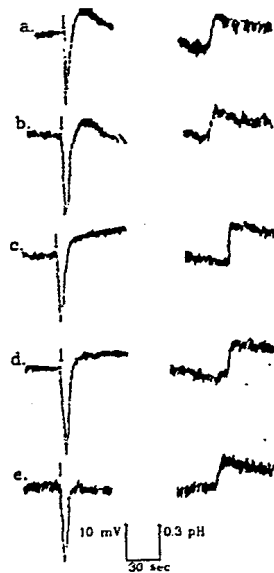


Fig. 7. Zn^{2+} inhibe la despolarización neta causada por el speract (130 nM).

a) Control, b) $0.2 \mu M ZnSO_4$, c) $0.5 \mu M ZnSO_4$, d) $1 \mu M ZnSO_4$, e) $5 \mu M ZnSO_4$, esta concentración fue suficiente para bloquear completamente la despolarización. Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado.

V. Discusión:

El speract claramente es un medio de comunicación entre el óvulo y el espermatozoide. En la naturaleza este péptido debe ser una de las señales que le dice al espermatozoide donde se encuentra el óvulo y a que distancia está. Esta información probablemente se detecta en forma de un gradiente, de ahí, el rango dinámico tan grande (5 ordenes de magnitud de ~ 2.5 pM a > 100 nM) de concentraciones de speract a las que el espermatozoide responde [Babcock y cols., 1992]. La Amplitud de este rango sugiere que probablemente existe mas de un receptor al speract [Yoshino y Suzuki, 1992]. Por otro lado el speract también podría ser una señal de preparación que le avisa al espermatozoide que está a punto de sufrir la RA (sobre todo cuando esta muy cerca de la superficie de óvulo y las concentraciones a las que esta expuesto son muy altas; probablemente saturantes).

Gracias a la estrategia de sustitución de iones es posible disectar la respuesta a este péptido, en condiciones saturantes, utilizando un número muy restringido de herramientas.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos podemos proponer una secuencia tentativa de los eventos que ocurren durante la respuesta del espermatozoide al speract:

En cuanto los espermatozoides se ponen en contacto con concentraciones altas de speract, hay una apertura de canales de K^+ [González-Martínez y Darszon, 1886]. El flujo de este ión genera una hiperpolarización que activa al intercambio de Na^+/H^+ causando una alcalinización del citoplasma [Lee, 1985]. Esta alcalinización probablemente tiene efectos muy importantes en la motilidad del flagelo (puesto que la dineína es muy sensible a pH y el) y tenga una influencia significativa en la modulación de canales iónicos, por otro lado, el cambio en la concentración intracelular de iones también es parte de la cascada de eventos que intervienen durante la respuesta al speract. Quizá la hiperpolarización, es capaz de quitar la inactivación de canales de Ca^{2+} , sin abrirlos. Al parecer, la hiperpolarización abre canales de Cl^- y de Na^+ dependientes de voltaje, lo que permite la salida de Cl^- y la entrada de Na^+ a la célula haciendo que se despolarize, la apertura de canales de Na^+ permiten la entrada de este catión gracias a su gradiente electroquímico, lo que causa una repolarización que a su vez activa a los canales de Ca^{2+} que también parecen ser dependientes de voltaje [González-Martínez y Cols, 1991], el cambio en la forma de la respuesta sugiere que son modulados por el Mg^{2+} . La entrada de Ca^{2+} es la responsable de la despolarización neta que sufre el espermatozoide, la entrada de Ca^{2+} posiblemente module el ritmo y la forma en que se mueve el flagelo reduciendo esto en quimiotaxis [Ward y Cols., 1885; Brokaw, 1991].

La función del Mg^{2+} podría ser meramente reguladora ya que es muy poco probable que este catión atraviese la membrana plasmática. Su función más evidente es la de regular la entrada de Ca^{2+} , sin embargo, la inhibición total de la

respuesta al speract cuando el medio está depletado de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , sugiere que la interacción del speract con su receptor también podría estar regulada de manera directa o indirecta por algún catión (Datos no mostrados). El candidato con mayor probabilidad de ser el modulador es el Mg^{2+} , el cual influye muy importantemente en fenómenos como el potencial de superficie que a su vez es capaz de regular, o cuando menos influir, en la función de moléculas que se encuentran en la superficie de la membrana plasmática. Cuando el espermatozoide se encuentra en un medio sin Na^+ , Ca^{2+} ni Mg^{2+} el potencial de superficie cambia de aproximadamente -26mV (potencial de superficie normal para espermatozoides hinchados) a aproximadamente -46mV . Especulando, esta hiperpolarización, cambia el medio ambiente local de la interfase (membrana celular-medio extracelular), cambiando así las propiedades de las moléculas que se encuentran en su superficie. Esto podría cambiar el comportamiento de receptores como el del speract y/o su capacidad de interacción con sus efectores así como el de canales y transportadores sensibles a potencial, pH y fuerza iónica. Por otro lado, parte de la respuesta al speract es transducida mediante el aumento en la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, los cuales, también son capaces de modular de manera directa o indirecta canales iónicos Ward y Cols, 1985; Dangott y Garbers, 1984].

El conocimiento del comportamiento del potencial de membrana en la célula hinchada nos ha dado información muy valiosa para establecer las condiciones óptimas para medir el potencial de membrana de las células normales. Ejemplos de los parámetros que hubo que establecer son: la sensibilidad de las señales a Na^+ extracelular, la concentración de células, la concentración de $\text{diS-C}_3\text{-5}$, etc.

Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, con espermatozoides sin hinchar sugieren que estos tienen una respuesta muy similar a la de los hinchados (Fig.4.e). Esta respuesta es un poco más rápida y sus proporciones varían ligeramente, sin embargo, sus componentes son homólogos. El hecho que hallamos utilizado y caracterizado la respuesta al speract con espermatozoides hinchados se debe a que las condiciones para medirla son más fáciles de establecer en estos y el interés de nuestro laboratorio en la utilización de células hinchadas en experimentos de electrofisiología para la caracterización a nivel molecular de canales.

El principal atractivo que tienen los espermatozoides hinchados se hace evidente cuando se plantean experimentos de "patch clamp" que son prácticamente imposibles de realizar en los espermatozoides normales. Sin embargo, es relativamente fácil hacer estos experimentos en espermatozoides hinchados [Babcock y Cols, 1992], esta estrategia se justifica al saber, que los resultados obtenidos en este sistema, son válidos en los espermatozoides no perturbados, las estrategias electrofisiológicas y fluorescentes, no son excluyentes, son complementarias y las mediciones con fluorescencia de parámetros fisiológicos de células enteras pueden darnos mucha información de

tipo macroscópico, así como un contexto global de los eventos celulares durante la respuesta de la célula a un estímulo.

Una aplicación directa de la información generada en este trabajo es, como ya se mencionó antes, la estandarización de las condiciones para este tipo de experimentos en espermatozoides sin hinchar (por tanto, menos perturbados), las condiciones para hacerlos ya casi están establecidas de manera que tenemos un nexo que nos permite extrapolar y complementar la información obtenida a tres niveles (patch clamp (mecanismos moleculares), células hinchadas y células intactas).

VI. Conclusiones.

- Los espermatozoides hinchados mantienen la integridad de su membrana plasmática.
- Mantienen homeostasis en su potencial de membrana, Ca_i , y pH_i .
- Responden a un rango dinámico muy amplio de concentraciones de speract (pM a nM).
- El potencial de reposo de los espermatozoides se hiperpolariza cuando los cationes extracelulares son removidos.
- La respuesta al speract de los espermatozoides hinchados y no hinchados es similar y la secuencia de eventos que la caracterizan es:
 1. Una hiperpolarización mediada por canales de K^+ seguida por:
 2. Una alcalinización del pH_i que es dependiente de Na^+ .
 3. Una repolarización dependiente de la entrada de Na^+ probablemente asistida por la salida de Cl^- .
 4. La depolarización neta causada por concentraciones nM de speract se debe a una entrada de Ca^{2+} .
 5. El Mg^{2+} parece modular la entrada de Ca^{2+} a la célula.
 6. El Zn^{2+} a concentraciones menores de $7\mu M$ es capaz de bloquear completamente la despolarización causada por el speract.

BIBLIOGRAFIA

- Babcock, D.F., Bosma, M., Battaglia and Darszon A., 1992, *Porc. Natl. Sci. USA* 89:6001-6005.
- Brokaw, C.J., *Cell Motil.*, 1991, 18:123-130
- Cabrini, G., Verkman, A.S., Friedman, J.E., J., 1986, *Membr. Biol.*, 90,163.
- Cabrini, G., Verkman, A.S., 1986, *J. Membr. Biol.*, 92,171
- Cerbón, J., Calderón, V., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.* 1028:261-267.
- Christen, R., Schackmann, R.W. and Shapiro, B.M., 1983, *J. Biol. Chem.* 258:5392-5399.
- Christen, R., Schackmann, R.W. and Shapiro, B.M., 1986, *J. Physiol.* 379:347-365.
- Chow, W.S., Barber, J., 1980, *J. Biochim. Biophys. Acta.* 589:346-352.
- Clapper, D.L., Davis, J.A., Lamothe, P.J., Patton, C. and Epel, D., 1985, *J. Cell. Biol.* 100:1817-1824.
- Chodavarapu, S.R. and Garbers, D.L., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:8390-8396.
- Darszon, A., Gould, M., De la Torre, L and Vargas, I., 1984 *Eur. J. Biochem.* 144:515-522.
- Dangott, L.J. and Garbers, D.,L., 1984, *J. Biol. Chem.* 259:13712-13716.
- Dangott, L.J., Chinkers, M., Goeddel, D.V., and Garbers, L. 1988, *Nature*, 334:708-712.
- Domino, S.E. and Garbers, D.L., 1988 *J. Biol. Chem.* 263(2):690-695.
- Evans, D.H. and Weigarten, K., 1990, *Toxicology* 61(3):275-281.
- Farach, A., Mundy, D., Strittmatter, W., Lennarz, W., 1987, *J. Biol. Chem.* 262(12):5483-5487.
- Garbers, D.L. and Hardmann, J.G., 1975, *Nature* 257:677-678.
- García-Soto, J. and Darszon, A., 1985, *Dev. Biol.* 110:338-345.
- García-Soto, J., Gonzalez-Martínez, M., De la Torre, L. and Darszon, 1987, *Dev. Biol.* 120:112-120.
- Gatti, J. and Christen, R., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:7599-7602.
- Gibbons, 1981, *Cell. Biol.* 91:107S-124.
- Gonzalez-Martínez, M. and Darszon, A., 1987, *FEBS Lett.* 218:247-250.
- Guerrero, A. and Darszon, A., 1988, *J. Gen. Physiol.*, 92:37a.
- Guerrero, A. and Darszon, A., 1989, *Biochim. Biophys. Acta*, 980:109-116.
- Guerrero, A., Sanchez, J. A. and Darszon, A., 1987, *FEBS Letters*, 220:295-298.
- Hansbrough, J.R. and Garbers, D.L., 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1447-1452.
- Hille, B., 1992 (libro): Sinauer Associates Inc. pag.466.
- Hirschie, C. and Epel, D., 1983, *J. Exp. Zool.* 226:431-440.
- Kopf, G.S. and Garbers, D.L., 1980, *Biol. Reprod.* 22:1118-1126.
- Lee, C., 1984, *J. Biol. Chem.* 259:15315-15319.
- Lee, H.C. and Garbers, D.L., 1986, *J. Biol. Chem.* 261:16026-16032.
- Lee, M. A. and Storey, B. T., 1985, *Biol. Reprod.* 33:235-246.
- Longo, F. and Anderson, E., 1969, *Ultrastruct. Res.* 27:486-509.
- McLaughlin, S. 1989, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18:113-136.
- Mourelle, M., Vargas, I. and Darszon, A., 1984, *Gamete Res.* 9:87-97.
- Morales, S., Tesis doc. CINVESTAV, dept. bioq., 1992.

- Sano, M., 1976, B. B. Acta 428:525-531.
- Schackmann, R.W. and Chock, P.B., 1986, J. Biol. Chem.261:8719-8728.
- Schackmann, R.W., Eddy, E.M. and Shapiro, B.M., 1978, Develop.Biol. 65:483-495.
- SeGall, M.J. and Lennarz, W.J., 1981, Develop. Biol. 86:87-93.
- Shimomura, H. Dangott, L.J. and Garbers, D.L., 1986, J. Biol.Chem. 261:15778-15782.
- Sim, J.A. and Cherubini, E. 1990, Neuroscience. 36(3):623-629.
- Suzuki, N., Shimomura, H., Randy, E.W., Ramarao, C.S., Ward, G.E., Swarup, G. and Garbers, D.L., 1982, Biol. Reprod. 26:953-960.
- Tilney, L. G., E. M. Bonder, L. M. Coluccio and M. S. Moosekar, 1983, j. Cell. Biol. 97:112-124.
- Tilney, L. G., and S. Inue.1982. J. Cell. Biol. 93:820-827.
- Trimmer, J.S., Tombridge, I.S. and Vacquier, V.D., 1985, Cell 40:697:703.
- Vaquier, V. D. 1975 Devel. Biol. 66:197-206.
- Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L. and Vacquier, V.D.,1985, J. Cell. Biol. 101:2324-2329.
- Yoshino, K. and Suzuki, N., 1992, Eur. J. Biochem. 206:887-893.