

-17
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"QUAUTITLAN"

DETERMINACION DEL POTENCIAL ELECTROSTATICO A TRAVES DE LA MEMBRANA POR TRIFENILMETILFOSFONIO EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO EYACULADO

FALLA DE ...

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
BEATRIZ ARACELI SANCHEZ PASTEN



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.

	HOJA
A.- RESUMEN	ix
B.- LISTA DE ABREVIATURAS	xi
C.- LISTA DE TABLAS	xiii
D.- LISTA DE FIGURAS	xiv
E.- LISTA DE GRAFICAS	xv
I.- OBJETIVOS	xvi
II.- INTRODUCCION	1
II.1.- Importancia del potencial eléctrico de membrana en la célula.	2
II.2.- El espermatozoide humano.	3
II.3.- Membrana celular. Algunas características.	8
II.4.- Potencial de membrana y métodos para su determinación.	11
II.5.- Acumulación del catión lipofílico tri- fenilmetilfosfonio como una medida para el potencial de membrana.	14
II.6.- Efecto de algunos agentes en el poten- cial de membrana.	16
III.- MATERIAL Y METODOS	21
III.1.- Material.	22

III.1.a.-	Reactivos.	22
III.1.b.-	Equipo.	24
III.1.c.-	Material Biológico.	24
III.2.-	Métodos.	24
III.2.a.-	Determinación del número de espermatozoides.	24
III.2.b.-	Determinación de viabilidad.	25
III.2.c.-	Determinación de movilidad.	25
III.2.d.-	Acumulación de TPMP ⁺ .	26
III.2.e.-	Determinación del volumen intracelular.	27
III.3.-	Condiciones experimentales.	28
III.3.a.-	Efecto del tiempo.	28
III.3.b.-	Efecto del número de esper- matozoides.	29
III.3.c.-	Efecto de la concentración de TPMP ⁺ .	29
III.3.d.-	Efecto de la temperatura.	29
III.3.e.-	Efecto del pH.	29
III.4.-	Variación de condiciones experimentales.	
III.4.a.-	Efecto de la Concentración de Na ⁺ y K ⁺ .	30
III.4.b.-	Efecto de la ouabaina.	30

III.4.c.- Efecto de la glucosa.	31
III.4.d.- Efecto de la valinomicina.	31
III.4.e.- Efecto del Ca^{++} .	31
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.	32
IV.1.- Condiciones experimentales	33
IV.2.- Variación de condiciones experimentales.	45
V.- CONCLUSIONES.	53
VI.- REFERENCIAS.	56

A.- RESUMEN

Algunas de las funciones fundamentales del espermatozoide (transporte a través de los investimentos del óvulo, reacción acrosomal y fertilización) involucran a la membrana. También ha sido demostrado que la velocidad de transporte de iones a través de los canales y bombas es regulada por los cambios en el potencial electrostático por lo que el estudio de este parámetro nos permitirá introducirnos en el área de la Bioquímica de la reproducción, así como a los métodos de anticoncepción masculina.

El potencial electrostático a través de la membrana ($\Delta\psi$) en el espermatozoide humano eyaculado, fue cuantificado mediante la acumulación de el catión lipofílico radiactivo trifenilmetilfosfonio ($^3\text{H-TPMP}^+$) en el interior de la membrana.

Los espermatozoides previamente lavados y contados se incubaron en presencia del $^3\text{H-TPMP}^+$ en los medios denominados pobre $-\text{K}^+$ y rico $-\text{K}^+$, hasta que se logra el estado de equilibrio (20 min a 37°C), bajo estas condiciones se obtiene un $\Delta\psi = -69 \pm 2\text{ mV}$.

Este $\Delta\psi$ se modifica al variar la temperatura y el pH.

La acumulación de TPMP^+ en los medios presumiblemente

es el resultado de la acumulación a través de las membranas que presentan un potencial interno negativo, indicando que el $\Delta\psi$ es el resultado de la difusión del K^+ hacia el exterior de la célula espermática.

Al aumentar progresivamente la concentración exterior de K^+ , la acumulación de TPMP⁺ disminuye drásticamente. Parecido comportamiento se observa cuando se adiciona a los medios ouabaina.

La presencia de glucosa en los medios pobre- K^+ y rico- K^+ induce incremento en la acumulación del TPMP⁺ por las células.

La presencia de valinomicina o de Ca^{++} en los medios de incubación provoca cierto aumento en el $\Delta\psi$.

Estos resultados nos indican que mediante la utilización de este agente lipófilico se pueden medir los cambios cuantitativos del $\Delta\psi$ en el espermatozoide humano eyaculado.

B.- LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\psi$: Potencial electrostático a través de la membrana.
spz : Espermatozoide.
R : Constante Universal de los Gases ($1.98 \frac{\text{cal}}{\text{K}^\circ \text{mol}}$).
T : Temperatura absoluta (310°K).
Z : Número de cargas de la molécula de soluto (+1).
F : Constante de Faraday ($23083 \frac{\text{cal}}{\text{mol V}}$).

$\left[\text{TPMP}^+ \right]_{\text{dentro}}$ corregido : Concentración intracelular del catión -
trifenilmetilfosfonio.

$\left[\text{TPMP}^+ \right]_{\text{fuera}}$: Concentración extracelular del catión -
trifenilmetilfosfonio.

$^3\text{H-TPMP}^+\text{Br}^-$: Bromuro de trifenilmetilfosfonio tritiao.
do.

$^3\text{H-TPMP}^+$: Catión trifenilmetilfosfonio tritiao.

TPMP^+ : Catión trifenilmetilfosfonio.

Medio pobre- K^+ : Medio pobre en ion potasio.

Medio rico- K^+ : Medio rico en ion potasio.

DPM : Desintegraciones por minuto.

CPM : Cuentas por minuto.

Ef.	:	Eficiencia.
Na ⁺	:	Ion sodio.
K ⁺	:	Ion potasio.
Ca ⁺⁺	:	Ion calcio
rpm	:	Revoluciones por minuto.
xg	:	Tantos la fuerza de gravedad.
hrs	:	Horas.
Ci	:	Curi.
g	:	Gramo.
min	:	Minutos.
M	:	Molar.
mM	:	Mili molar.
mmol	:	Mili mol.
mCi	:	Mili curi.
μl	:	Micro litro.
μM	:	Micro molar
μCi	:	Micro curio
nl	:	Nano litro.
cal	:	Calorías
°K	:	Grados Kelvin.
mol	:	Mol.
V	:	Volts.
mV	:	Mili volts.
ln	:	Logaritmo natural

C.- LISTA DE TABLAS

	HOJA
Tabla 1.- Relación entre actividad celular y potencial de membrana.	04
Tabla 2.- Algunos cambios en membrana plasmática de espermatozoide durante la maduración.	07
Tabla 3.- Métodos para determinar el potencial de membrana celular.	13
Tabla 4.- Efecto de varios inhibidores e ionóforos sobre la acumulación al estado-estable de TPMP ⁺ por células alveolares.	17
Tabla 5.- Valores de $\Delta\psi$ obtenidos para algunos agentes.	52

D.- LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.- Representación esquemática de las partes del espermatozoide humano.	05
Figura 2.- Modelo de Singer y Nicolson.	06
Figura 3.- Posible efecto del campo eléctrico transmembrana sobre la configuración de proteínas de membrana.	11



2.- LISTA DE GRAFICAS

	HOJA
Gráfica 1.- Efecto del tiempo sobre la acumulación de TPMP ⁺ en el espermatozoide.	34
Gráfica 2.- Efecto del número de espermatozoide sobre la acumulación de TPMP ⁺ .	36
Gráfica 3.- Efecto de la concentración de TPMP ⁺ en espermatozoide humano.	37
Gráfica 4.- Efecto de la temperatura sobre el ΔY en el espermatozoide humano.	39
Gráfica 5.- Efecto del pH sobre el ΔY en el espermatozoide humano.	41
Gráfica 6.- Efecto de la concentración externa de Na ⁺ y K ⁺ sobre la acumulación de TPMP ⁺ en el espermatozoide humano.	46
Gráfica 7.- Efecto de la ouabaina sobre el ΔY en el espermatozoide humano.	48
Gráfica 8.- Efecto de la glucosa sobre la acumulación de TPMP ⁺ en el espermatozoide humano.	50

I.- OBJETIVOS

- 1.1.- Determinar las condiciones experimentales de: tiempo de incubación, número de células, concentración adecuada del TFMP⁺, temperatura óptima y pH adecuado a las que se deberá trabajar con los espermatozoides para lograr el objetivo siguiente.
- 1.2.- Determinación del potencial electrostático del espermatozoide humano eyaculado, en función de la acumulación del catión lipofílico trifenilmetilfosfonio por seguimiento radiactivo del tritio (³H-).
- 1.3.- Efectuar algunos ensayos con posibles agentes capaces de alterar el $\Delta\psi$ en las células espermáticas.

II.- INTRODUCCION

II.1.- IMPORTANCIA DEL POTENCIAL ELECTRICO DE MEMBRANA EN LA CELULA.

En el área de Biología de la Reproducción, las membranas juegan un importante papel en funciones tales como agregación, reacción acrosomal, transporte a través de los investmentos del óvulo, entre otras; por lo que es de gran importancia estudiar la membrana del espermatozoide y los cambios en la estructura y/o función que acompañan a estos procesos^{17,26,28}, mediante la valoración del potencial eléctrico transmembrana el cual es resultado de la distribución de iones a ambos lados de la membrana.

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que el potencial eléctrico a través de la membrana ($\Delta\psi$), esta íntimamente involucrado en la función de varios tipos de células^{14,31}. Se ha demostrado una interacción específica entre actividad celular y alteraciones en la distribución de iones responsables de la generación del potencial^{10,19}, por lo que, cambios en la distribución de iones puede repercutir en el comportamiento eléctrico y por consiguiente en la actividad biológica de la célula²⁵.

El potencial eléctrico ha sido utilizado como -

una variable importante en la regulación de las funciones de las membranas ya que es capaz de producir interacciones electrostáticas (atracciones o repulsiones) entre una y otra célula debido a cambios importantes en la estructura y configuración macromolecular de los constituyentes de la biomembrana³¹; existiendo la posibilidad de que mediante el estudio del $\Delta\psi$ se puedan "regular" estas funciones celulares⁴. (Tabla 1).

De ahí el interés de que algunos autores han reportado cambios en las propiedades eléctricas de la membrana plasmática del espermatozoide durante su desarrollo (maduración y transporte epididimario)^{21,30}, así como fertilización^{21,27} y capacitación^{19,21}.

Al introducirse en el estudio de los cambios eléctricos producidos en la membrana del espermatozoide, es necesario un panorama general.

II.2.- EL ESPERMATOZOIDE HUMANO.

El uso del microscopio electrónico y la aplicación de modernos métodos de tinción permitió determinar la morfología del espermatozoide humano¹³. Esta célula sexual masculina es considerada como una de las más diferenciadas del organismo, (Figura 1). Los espermatozoides se producen durante el transcurso de

TABLA 1.- RELACION ENTRE ACTIVIDAD CELULAR Y POTENCIAL DE MEMBRANA

TIPO CELULAR	ACTIVIDAD CELULAR	RESPUESTA CELULAR
Chorella vulgaris ¹³	Transporte electrogénico	Despolarización
Spz de Toro ²⁹	Influencia catiónica en movilidad	Hiperpolarización
Spz de Jabali ¹⁹	Cambios producidos por anestésicos locales	Despolarización
Células Blancas ³¹	Efecto de hormonas	Hiperpolarización
Células Nerviosas ^{1,20}	Efecto de toxina tetánica	Hiperpolarización
	Efecto de metabolismo de glucosa	
Levadura ³	Características sobre toma de catión	Despolarización
Granulocitos ¹⁴	Cambios que anteceden respuesta metabólica	Hiper/Despolarización

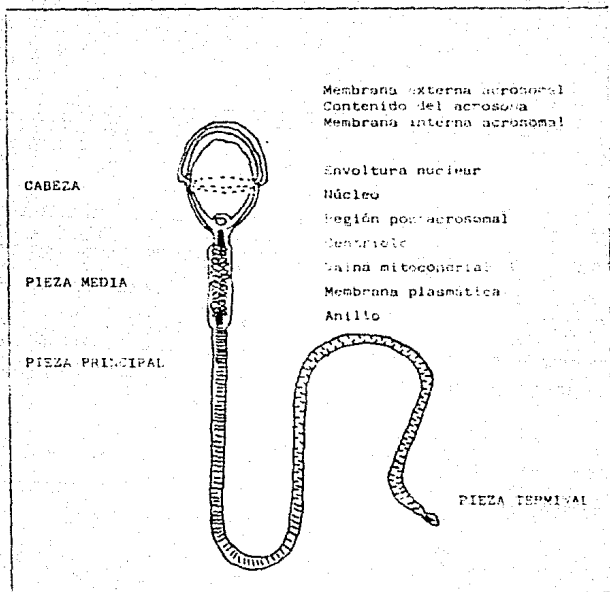


FIGURA 1.- Representación esquemática de las partes del espermatozoide humano⁸.

un proceso de diferenciación celular llamado "espermatogénesis" en los testículos, los cuales están constituidos por túbulos seminíferos en donde los espermatozoides son morfológica y metabólicamente inmaduros, con deficiente movilidad y sin capacidad fertilizante^{12,23,30}.

Los espermatozoides una vez que han terminado su desarrollo continúan su trayectoria por el epidídimo, el cual es un conducto largo altamente enrollado al cual se le distinguen tres regiones: cabeza, cuerpo y cola; este conducto proporciona un medio ambiente adecuado para la supervivencia y desarrollo del espermatozoide. Durante el transcurso de estas células por el epidídimo se incluye su maduración^{22,23}, en la cual se involucran cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, tales como: la adquisición de la habilidad fertilizante^{21,27}, cambios en la bioquímica de la utilización de sustrato^{13,19} y desarrollo de movilidad^{17,19,21,25}. Todos estos cambios implican importantes alteraciones en la estructura de la membrana del espermatozoide^{7,21}. (Tabla 2).

Durante la eyaculación, el espermatozoide experimenta profundos e irreversibles cambios bioquímicos como resultado del contacto con el plasma seminal^{12,13,22,23}.

TABLA 2.- ALGUNOS CAMBIOS EN MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACION³⁰.

FENOMENO	SITIO
Adsorción de antígeno, glicoproteínas, ácido siálico y otros.	Testículo
Cambios en la carga negativa neta de superficie.	Testículo-epidídimo Epidídimo Vasos deferentes
Cambios en la distribución del patrón de partículas intramembranas.	Epidídimo
Cambios en actividad de ATPasa de superficie.	Epidídimo
Cambios en composición lipídica e integridad.	Testículo-epidídimo
Reducción de grupos SH de superficie.	Epidídimo
Posible adsorción o integración de carnitina, acetilcarnitina, gliceril fosforilcolina y lípidos.	Epidídimo

Durante su paso a través del tracto reproductor-femenino para llegar a fertilizar al óvulo, el espermatozoide desarrollará su capacitación^{19,21} adaptándose a las variaciones del medio ambiente que le proporcionan las diferentes zonas del tracto femenino y donde requerirá de la presencia de un sistema de transporte muy preciso y regulado en la membrana espermática^{2,24,28}.

II.3.- MEMBRANA CELULAR. (Algunas características).

Lo anterior nos lleva a recordar que las membranas celulares sirven como barreras estructurales, las cuales, separan compartimientos acuosos de composición variable y juegan un papel importante en casi todo fenómeno celular: intercambio de la célula con su medio ambiente, transducción de energía, transporte activo, interacción hormonal, conducción de impulsos nerviosos, etc.^{5,26}. La participación de la membrana en estos procesos biológicos despertaron el interés de los científicos que les llevó a determinar el llamado "Modelo del Mosaico Fluido", el cual fué presentado para toda membrana biológica. (Figura 2).

Las membranas son asociaciones lipo-protéicas en donde estos componentes forman una delgada lámina y en la que también pueden estar presentes carbohidratos.

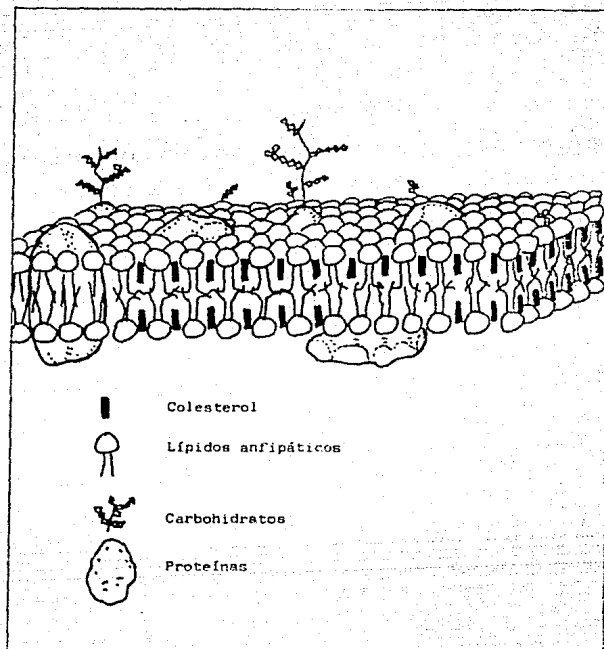


FIGURA 2.- Modelo de Singer y Nicolson²⁶.

El modelo de la membrana propuesto por Singer y Nicolson, presenta una doble capa de lípidos del tipo anfipático, además del colesterol y se proponen dos categorías de proteínas.

Las proteínas integrales o intrínsecas penetran en los lípidos, donde las cadenas laterales de los aminoácidos no polares se concentran principalmente en la superficie de la molécula proteica formándose interacciones hidrofóbicas con las cadenas de ácidos grasos de los lípidos. También poseen residuos de aminoácidos hidrofílicos en parte de su superficie, lo cual les permite sobresalir más allá de la doble capa lipídica con la posibilidad de efectuar interacciones con sustancias hidrosolubles (iones, sustrato de bajo peso molecular, hormonas, etc.) en la superficie de la membrana.

Las proteínas periféricas o extrínsecas están asociadas con la membrana por enlaces electrostáticos débiles, ya sea a los grupos hidrofílicos de los lípidos o con más frecuencia a las porciones hidrofílicas de las proteínas intrínsecas sobresalientes de la doble capa^{5,26}.

Las proteínas presentan grupos SH, los cuales son importantes en la estructura y función de la membrana^{24,28} ya que intervienen en la regulación metabó

lica particularmente en el transporte iónico y reconocimiento de antígeno^{15,16}; encontrándose una íntima relación con el porcentaje de grupos polares y no polares presentes en la membrana^{2,3,7}. (Figura 3).

II.4.- POTENCIAL DE MEMBRANA Y METODOS PARA SU DETERMINACION.

El $\Delta\psi$ en sistema nervioso, eritrocitos y bacteria⁹,^{10,14,29}, presenta una caracterización en términos de dos componentes: uno determinado por la naturaleza electrogénica de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), y el otro de acuerdo al gradiente de concentración de iones existentes descrito por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz^{9,13,31}. Alteraciones de cualquiera de estos dos componentes, difusión o bomba electrogénica puede producir cambios en el $\Delta\psi$ 31.

La medida del $\Delta\psi$ en células aisladas ha sido ampliamente estudiado por una variedad de métodos. (Tabla 3).

II.4.a.- Técnicas electrofisiológicas directas. Utilización de microelectrodos; esta considerado un método altamente cuantitativo, pero presenta dificultad en células pequeñas ($\leq 12 \mu\text{m}$) y que puede provocar ruptura de la membrana plasmática al momento de insertar el microelectrodo provocando una salida iónica severa

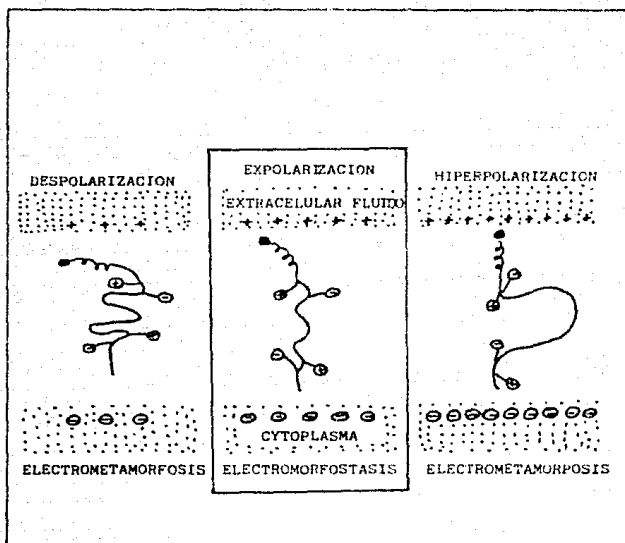


FIGURA 3.- Posible efecto del campo eléctrico transmembrana sobre la configuración de proteínas de membrana³¹.

Configuración proteica: estructura actividad biológica
 dipolos campo eléctrico.

TABLA 3.- METODOS PARA DETERMINAR EL POTENCIAL DE MEMBRANA CELULAR.

TIPO CELULAR	METODO	POTENCIAL DE MEMBRANA
Linfocitos ⁹	Ión lipofílico	56.5 ± 1.3 mV
Alga Verde ¹³	Ion lipofílico	-135 mV
Célula Alveolar ¹⁰	Ion lipofílico	-62.9 ± 4 mV
Granulocitos ¹⁴	Ion lipofílico	-26.7 mV
Sinaptosomas ²⁰	Ion lipofílico	-60 a -80 mV
Levadura ³	Ion lipofílico	-75 mV
Spz de Toro ²⁹	Microelectrodo	-5.5 mV
Huevos de Eri- zo de Mar ²⁷	Microelectrodo	-8 a -15 mV
Terminales Ner- vianas ¹	Fluorescencia	---
Spz de Jabali ¹⁹	Fluorescencia	---
Spz de Conejo y Humano ¹⁶	Fluorescencia	---
Spz de Humano ¹⁷	Fluorescencia	---
Spz Humano ^{24,28}	Polarografía	190±24uAx10 ⁸ spz

por lo que los valores obtenidos por este método son inciertos^{2,3,4,11}.

II.4.b.- Prueba fluorescente de la membrana. Este método está fundamentado para valores cuantitativos del $\Delta\psi$, pero se cuestiona su aplicación en la determinación al estado-estable de la célula ya que esta técnica altera la fisiología de la célula^{10,19,27}.

II.4.c.- Estudios polarográficos. Se trata de una técnica electroanalítica que también tiene reportados estudios en la determinación del $\Delta\psi$. Ha sido poco estudiado por la dificultad que presenta la correcta interpretación de los resultados^{24,26}.

II.4.d.- Uso de iones lipofílicos. La cuantificación del $\Delta\psi$ debido a la distribución a través de la membrana de iones radiactivos como: cloro ($^{36}\text{Cl}^-$)^{9,27}, sulfocianuro (SCN^-)²⁷, tetrafenilfosfonio ($^3\text{H-TPP}^+$)^{3,13,20,27} y trifenilmetilfosfonio ($^3\text{H-TPMP}^+$)^{9,10,14}.

II.5.- ACUMULACION DEL CATION LIPOFILICO TRIFENILMETILFOSFONIO COMO UNA MEDIDA PARA EL POTENCIAL DE MEMBRANA.

Iones lipofílicos no fisiológicos (TPP^+ y TPMP^+) han sido usados para determinar el $\Delta\psi$ en membranas y organelos celulares, demostrando con membranas artificiales que estos iones penetran en forma iónica¹³.

Estos iones penetran en forma pasiva a través de la membrana plasmática distribuyéndose dentro de la célula y solución exterior de acuerdo a la diferencia de potencial eléctrico, observando un comportamiento lineal. El promedio de afluencia del catión es directamente dependiente sobre el $\Delta\psi$ y puede ser seguido en minutos.

En base a lo anterior el $\Delta\psi$ puede ser calculado de acuerdo a la proporción de distribución del catión lipofílico lo que corresponde a la diferencia de potencial eléctrico sustituido en la ecuación de Nernst^{5,10,13,14}; representada en la siguiente forma:

$$\Delta\psi = - \frac{R T}{Z F} \ln \frac{[TPMP^+]_{\text{dentro}}^{\text{corregido}}}{[TPMP^+]_{\text{fuera}}}$$

Donde:

- $\Delta\psi$ = Potencial eléctrico transmembrana.
- R = Constante universal de los gases.
- T = Temperatura absoluta.
- Z = Número de cargas de la molécula del soluto.
- F = Constante de Faraday.

$[TPMP^+]_{\text{dentro}}^{\text{Corregido}}$ = Concentración intracelular del catión lipofílico.

$[TPMP^+]_{\text{fuera}}$ = Concentración extracelular del catión lipofílico.

II.6.- EFECTO DE ALGUNOS AGENTES EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA.

La acumulación del catión lipofílico no es proceso simple que tan solo dependa del $\Delta\psi$, debe considerarse si algunos agentes son adicionados extracelularmente que puedan afectar dicha acumulación y la posible toma por compartimientos intracelulares (mitocondria principalmente)^{9,10,29}. Sin embargo la experiencia indica que el efecto de organelos o adsorción inespecífica no falsificará los resultados del $\Delta\psi$ por tan solo unos milivolts (20 a 30 mV)¹³. (Tabla 4).

II.6.a.- Concentración de Na^+/K^+ .

Es reconocida la existencia del transporte de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática, este transporte activo es esencial para el mantenimiento del gradiente de concentración de dichos iones, por lo que el efecto de estos cationes sobre la acumulación del TPMP⁺ en membranas es sumamente importante.

Se han hecho estudios sobre la influencia de K^+ extracelular, debido a que tiene baja permeabilidad en membrana citoplasmática siendo relativamente impermeable⁹. Variaciones en la concentración de este ion y manteniendo la osmolaridad constante, se produce -

TABLA 4.- EFECTO DE VARIOS INHIBIDORES E IONOFOROS SOBRE LA ACUMULACION AL ESTADO-ESTABLE DE TPMP⁺ POR CELULAS ALVEOLARES^{4,10}.

TRATAMIENTO	% CELULAS ASOCIADAS TPMP ⁺	
	5 min	30 min
Control	100	100
KCN (2 nM)	107 ± 8	38 ± 15
Ouabafina (1 nM)	78 ± 10	63 ± 7
Valinomicina (2 uM)	29 ± 4	1 ± 2
Calcio A23187 (100 ug/ml)	8 ± 9	-

despolarización en donde el $\Delta\psi$ es fuertemente dependiente sobre el gradiente de concentración de K^+ ^{1,9}.
10,29.

Para el Na^+ , sin embargo, todavía no es bien conocida su función en la determinación del $\Delta\psi$. Se sabe que puede penetrar al interior de la célula independientemente del transporte de sustrato y activar la ATPasa; así como el ser indispensable en la movilidad del espermatozoide^{1,10,29}.

II.6.b.- Presencia de ouabaina.

Puesto que la generación de los gradientes de concentración Na^+/K^+ a través de la membrana plasmática podrían ser debido a la acción de la enzima ATPasa(Na^+-K^+), se han hecho estudios en diferentes tipos celulares sobre el efecto de la ouabaina en el mantenimiento de el gradiente de concentración de estos iones y su posible relación con el valor de $\Delta\psi$.

Se ha determinado que la ouabaina (glucósido cardíaco que inhibe específicamente la acción de la ATPasa, inhibe la actividad de la bomba (Na^+-K^+), disminuyendo la afluencia del ion K^+ .

II.6.c.- Concentración de glucosa.

La concentración de glucosa presente en diferentes fluidos biológicos asegura un adecuado apoyo metabólico para las células, ya que es el sustrato del me

metabolismo de carbohidratos en las células vivas^{1,2}.

En bacterias, células intestinales y células nerviosas se ha propuesto un mecanismo de transporte para la glucosa, el cual es atribuido a proteínas de la membrana llamadas traslocadores que median su entrada a la célula. Este mecanismo requiere de gasto de energía y presencia de Na^+ .

El interés en la glucosa, se debe a que la estimulación metabólica por adición de un sustrato para la glicólisis o metabolismo oxidativo incrementa el $\Delta\psi$ 19.

II.6.d.- Presencia de valinomicina.

En la membrana existen sistemas enzimáticos que rigen importantes funciones celulares, entre las que se encuentra el transporte de iones Na^+ y K^+ .

Los antibióticos han sido utilizados en células bacterianas para estudiar el intercambio iónico a través de la membrana celular.

La valinomicina, antibiótico que penetra a través de la fracción lipídica de la membrana plasmática y mitocondrial en casi todas las células, "atrapa" espontánea y reversiblemente iones K^+ en su estructura química, por lo que una pequeña cantidad de valinomicina puede transportar grandes cantidades de K^+ a través de la membrana y equilibrar las concentraciones -

intra y extracelular de éste ion^{10,19}.

La adición de valinomicina a una suspensión de - mitocondrias en un medio que contiene K^+ , produce flujo del ion a nivel de membrana, así como el incremento de la permeabilidad para otros iones (Na^+ , Cl^-)^{10, 19} afectando el $\Delta\Psi$, y llegando a su abolición².

II.6.e.- Concentración de Ca^{++} .

Ha sido demostrado que la velocidad de transporte de iones a través de los canales y bombas es regulada por los cambios en el $\Delta\Psi$. Esta propiedad de las membranas es de interés para la membrana espermática, debido a la posibilidad de que cambios en el $\Delta\Psi$ de esta célula podrían afectar el transporte activo del Ca^{++} , reacción que parece ser necesaria para los procesos de capacitación y reacción acrosomal en el - espermatozoide⁵.

Estudios sobre el Ca^{++} permitieron saber que es un ion con fácil penetrabilidad celular¹⁰ y su presencia favorece la actividad de la bomba electrogénica³.

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- MATERIAL

III.1.a.- REACTIVOS.

- Medio Peterson-Freud I: medio "pobre-K⁺".

Cloruro de sodio	0.113	M
Tris (hidroximetilamonio) metano HCl	0.02	M
Fosfato de sodio dibásico	0.0025	M
Fosfato de sodio monobásico	0.0025	M
Cloruro de magnesio	0.003	M
Piruvato de sodio	0.003	M
Glucosa	0.03	M
pH	7.4	

- Medio Peterson-Freud II: medio "rico-K⁺".

Cloruro de potasio	0.113	M
Tris (hidroximetilamonio) metano HCl	0.02	M
Fosfato de potasio dibásico	0.0025	M
Fosfato de potasio monobásico	0.0025	M
Cloruro de magnesio	0.003	M
Piruvato de potasio	0.003	M
Glucosa	0.03	M
pH	7.4	

- [$^3\text{H-TPMP}^+\text{Br}^-$]	: Bromuro de trifenil-	
	metilfosfonio tritig	
	do	110 μM
	Actividad especifica	2.5 Ci/mmol
- ^{14}C -sorbitol		0.05 μCi
	Actividad especifica	285 mCi/mmol
- Solueno-350		250 μl
- $^3\text{H}_2\text{O}$		0.1 μCi
	Actividad especifica	250 $\mu\text{Ci/g}$
- [K^+]		113 mM
- [Na^+]		113 mM
- Colina		113 mM
- Ouabaina		113 mM
		$100 \times 10^{-6} \text{M}$
		200 " M
		500 " M
- Glucosa		10 mM
		20 "
		30 "
- Valinomicina		10 mM
- [Ca^{++}]		5 mM

Los reactivos de grado analítico fueron obtenidos de Radiochemical Centre, New England Nuclear Chemicals, Sigma Chemical Co., E. Merk.

III.1.b.- EQUIPO.

Espectrofotómetro de Centelleo Líquido Packard-Tri - Carb, modelo 3390.

III.1.c.- MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización del presente estudio, se utilizaron muestras de semen humano recién eyaculado, obtenido de donadores normales y fértiles con abstinencia sexual de por lo menos tres días previos a la recolección de la muestra.

Los spz fueron separados del plasma seminal por centrifugación durante 20 min a 2800 rpm. El paquete celular resultante fue resuspendido en un medio propuesto por Peterson y Freud I¹⁹ y centrifugado a 1000 x g durante 10 min. Este lavado se repite dos veces más con el objeto de eliminar trazas del plasma seminal.

III.2.- METODOS

III.2.a.- DETERMINACION DEL NUMERO DE ESPERMATOCOIDES

El número de spz se determinó por el método del hematocitómetro. Este método consiste en aspirar con una micropipeta para leucocitos, la suspensión de spz hasta la marca de 0.5 y completar hasta 11 con el medio de Peterson y Freud I, - se agita firmemente con -

el fin de homogenizar la suspensión y se desechan las tres primeras gotas antes de llenar la cámara de Neubauer; dejar pasar 10 min con el objeto de que las células sedimenten. A continuación se coloca la cámara en la platina del microscopio óptico y se localiza la cuadrícula, se procede a contar los spz que se encuentren en los cuadros de los vértices y en el central. El número de células se suman y el resultado se multiplica por 20, que es el factor de dilución empleada, por 5 que corresponde a la quinta parte de la cuadrícula y por 10,000 que es el volumen de la cámara; obteniendo el número de spz expresado en millones/ml de la suspensión celular.

III.2.b.- DETERMINACION DE LA VIABILIDAD.

La viabilidad de los spz se determinó por el método de exclusión trypan.

Se tomaron 50 μ l de la suspensión de spz a los que se adicionaron 25 μ l del colorante azul trypan, y se incubaron a 37°C por 5 min.

Posteriormente se valora la viabilidad de los spz mediante la observación al microscopio de las células coloreadas (muertas) y las no coloreadas (vivas).

III.2.c.- DETERMINACION DE LA MOVILIDAD.

La movilidad de los spz fue valorada a temperatura ambiente mediante la observación al microscopio - dentro de las dos primeras horas de recolección. Se colocan 25 μ l de semen sobre un porta y se le sobrepone el cubreobjetos, evaluando la movilidad de los spz.

III.2.d.- ACUMULACION DE TPMP'.

Los spz fueron resuspendidos, contados y ajustados a 10^8 spz/ml con el medio Peterson-Freud I.

Alícuotas de esta suspensión conteniendo 2×10^7 - spz, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min. La mitad de las muestras de spz así obtenidas se resuspendieron en 100 μ l del medio Peterson-Freud I, a esta solución se le denominó medio "pobre-K⁺"; las muestras de spz restantes se resuspendieron en 100 μ l del medio Peterson-Freud II, a esta solución se le denominó medio "rico-K⁺".

Ambos medios fueron preparados para contener - ^3H -TPMP' a una concentración de 110 μM con una actividad específica de 2.5 Ci/mmol y ^{14}C -sorbitol a una - concentración de 0.05 μCi con una actividad específica de 285 mCi/mmol.

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 min con agitación constante, enseguida fueron centrifugados a 5000 x g durante 2 min. El sobrenadante se -

descarto y los spz se lavaron con el medio correspondiente.

Los spz se disolvieron durante 8 hrs en 250 μ l de suelno-350 y se cuantificó la radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Los cálculos para la cuantificación del $\Delta\Psi$ se obtuvieron a partir de la acumulación del TPMP⁺ en el spz, corregido por la cantidad de TPMP⁺ atrapado en el espacio intercelular, mediante la cantidad de ¹⁴C-sorbitol medido en cada muestra, transformado a valores de concentración utilizando el volumen intracelular (más adelante es descrito).

Este valor es utilizado para calcular el $\Delta\Psi$ usando la ecuación de Nernst de la forma descrita:

$$\Delta\Psi = - RT/ZF \ln \frac{[\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{corregido}}}{[\text{TPMP}^+]_{\text{fuera}}}$$

III.2.e.- DETERMINACION DEL VOLUMEN INTRACELULAR.

Los tubos conteniendo 2×10^7 spz, se resuspendieron en 100 μ l de los medios "pobre-K⁺" y "rico-K⁺". Ambos medios contienen 0.1 μ Ci de ³H₂O con una actividad específica de 250 μ Ci/g y 0.005 μ Ci de ¹⁴C-sorbitol con una actividad específica de 285 mCi/mmol, siendo incubados a 37°C durante 20 min. inmediatamente

te se centrifugaron a 5000 x g por 1 min. El sobrenadante se descartó y los spz se solubilizaron con 200 µl de solvente-350 durante 8 hrs a temperatura ambiente y se cuantificó la radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Para obtener los valores de volumen intracelular se requirió de las siguientes fórmulas.

$$DPM^{14}C = \frac{CPM^{14}C}{\frac{Ef^{14}C \text{ en el canal del } ^{14}C}{100}}$$

$$DPM^3H = \frac{CPM \text{ en el canal } ^3H - (Ef^{14}C \text{ en el canal } ^3H)(DPM^{14}C)}{\frac{Ef^3 \text{ en el canal } ^3H}{100}}$$

III.3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES.

ACUMULACION DE TPMP⁺.

La incorporación de TPMP⁺ en la membrana del spz se lleva a cabo en los medios "pobre-K⁺" y "rico-K⁺". Ambos medios fueron preparados para contener ³H-TPMP⁺ a una concentración de 110 µM con una actividad específica de 2.5 Ci/mmol y 0.05 mCi de ¹⁴C-sorbitol con una actividad específica de 285 mCi/mmol.

III.3.a.- EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Los tubos fueron incubados a 37°C a diferentes -
tiempos: 5,10,20 y 60 min.

III.3.b.- EFECTO DEL NUMERO DE ESPERMATOZOIDES SOBRE
LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 min
cambiando en forma creciente el número de spz: 10,20
y 30 x 10⁶ spz.

III.3.c.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TPMP⁺ SOBRE
LA ACUMULACION DEL MISMO ION.

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 min
y variando la concentración del TPMP⁺: 25,50,100 y -
200 µM.

III.3.d.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACUMULA-
CION DE TPMP⁺.

Los tubos fueron incubados durante 20 min a dife-
rentes temperaturas: 30,33,37 y 40°C.

III.3.e.- EFECTO DEL pH SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 min
a los siguientes valores de pH: 3,5,7 y 9.

La incubación para todos los casos se realizó -
con agitación constante y posteriormente centrifuga--
dos a 5000 x g durante 2 min. El sobrenadante se des-
cartó y los spz se lavaron con el medio correspondien-
te. Las células se disolvieron durante 8 hrs en 250
µl de solueno-350 y se cuantificó la radiactividad -

en el espectrofotómetro de centelleo líquido.

III.4.- VARIACION DE CONDICIONES EXPERIMENTALES.

ACUMULACION DE TPMP⁺.

Los spz fueron incubados a 37°C en los medios "pobre-K⁺" y "rico-K⁺", ambos medios conteniendo ³H-TPMP⁺ a una concentración de 110 μM con una actividad específica de 2.5 Ci/mmol y 0.05 mCi de ¹⁴C-sorbitol con una actividad específica de 285 mCi/mmol hasta su estado de equilibrio (20 min) y posteriormente se estudió el efecto de diversos agentes al ser agregados a los medios de incubación.

III.4.a.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE Na⁺ Y K⁺ SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

El efecto de la concentración de K⁺ sobre la acumulación de TPMP⁺ fue estudiada bajo dos condiciones experimentales: a) para el primer caso la colina fue sustituida del medio de incubación por el K⁺, de tal manera que siempre se mantuviera la relación (colina) + (K⁺) = 113 mM; b) en el segundo caso se sustituye el K⁺ del medio de incubación por Na⁺ de tal manera que se mantenga la concentración inicial de 113 mM.

III.4.b.- EFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Se estudió el efecto de la ouabaina al ser agregada a diferentes concentraciones a los medios de incubación: 100, 200 y 500 x 10⁻⁶M.

III.4.c.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Los spz fueron incubados en presencia de glucosa a una concentración de 30 mM. Transcurridos 20 min se adiciona glucosa a diferentes concentraciones: 10, 20 y 30 mM.

III.4.d.- EFECTO DE LA VALINOMICINA SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

La valinomicina se adiciona al medio de incubación a una concentración de 10 mM.

III.4.e.- EFECTO DEL Ca⁺⁺ SOBRE LA ACUMULACION DE TPMP⁺.

Adicionar Ca⁺⁺ al medio de incubación a una concentración de 5 mM.

Todos los tubos se incubaron con agitación constante durante 20 min y posteriormente fueron centrifugados a 5000 x g durante 2 min. El sobrenadante se descartó y los spz se lavaron con el medio correspondiente. Disolver las células por 8 hrs en presencia de 250 µl de solueno-350 y se cuantifica la radiactividad en el espectrofotómetro de centelleo líquido.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

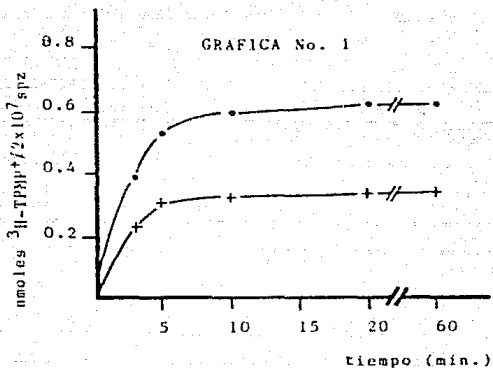
IV.1.- CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Cuando los spz se incubaron en los medios pobre- K^+ y rico- K^+ , la acumulación de $TPMP^+$ es rápida durante los primeros 10 min, y se mantiene aproximadamente a partir de los 20 min. El estado de equilibrio que se obtiene por más de 60 min está representado en la meseta que se observa. (Gráfica 1).

La acumulación de $TPMP^+$ durante los primeros minutos es rápida debido a la inmediata respuesta de la membrana al percibir un gradiente iónico Na^+/K^+ en los medios de incubación; además de que se puede considerar la superficie negativa de la membrana espermática y suponer una atracción electrostática entre cargas opuestas.

En el medio pobre- K^+ es mayor la acumulación de $TPMP^+$ ya que se encuentra favorecida la difusión de K^+ al exterior provocada por la diferencia en el gradiente de concentración de éste ion a ambos lados de la membrana. La salida de K^+ de la célula provocará una baja en el gradiente iónico interno que facilitará la difusión del $TPMP^+$ hacia la célula.

La variación en la captación de $TPMP^+$ por la membrana del spz se considera como una respuesta a los cambios del $\Delta\psi$ en la membrana debido a la difusión de K^+ .



Efecto del tiempo sobre la acumulación de $^3\text{H-TPMP}^+$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron en los medios pobre- K^+ (o—o) y rico- K^+ (x—x) a 37°C a tiempos dados.

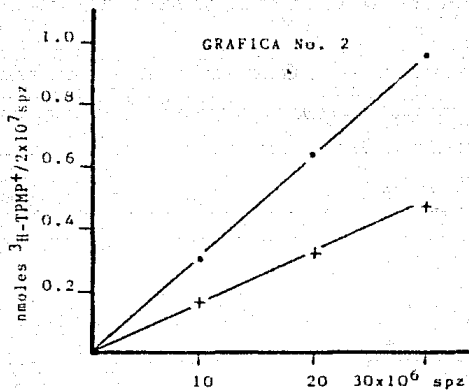
Cada punto indica la medida \pm la desviación estandar de 8 determinaciones.

Para el medio rico- K^+ , la alta concentración de ion K^+ en el medio extracelular provocará por un lado, un aumento en la permeabilidad de la membrana espermática para iones pequeños (Na^+ y K^+) que difundirán a través de ella con el fin de equilibrar la diferencia del gradiente Na^+/K^+ ; y por otro lado, se sabe que el ion K^+ presenta baja permeabilidad a través de la membrana por lo que difícilmente difundirá. Pero el TPMP⁺ difunde libremente a través de la membrana acumulándose en aquellas membranas que presentan potencial eléctrico negativo, principalmente en la mitocondria en donde se llevará a cabo la difusión de K^+ como respuesta a la diferencia en el gradiente de concentración Na^+/K^+ .

Se mantiene estable la acumulación del TPMP⁺ (Gráfica 1) una vez que se llega al equilibrio entre el TPMP⁺ y el $\Delta\psi$ como resultado de la difusión iónica, o bien de la estabilidad en el gradiente de concentración a ambos lados de la membrana.

El nivel alcanzado para la acumulación de TPMP⁺ en los medios pobre- K^+ y rico- K^+ muestran una relación lineal con respecto al número de células espermáticas y un comportamiento similar en función de la concentración del TPMP⁺. (Gráficas 2 y 3).

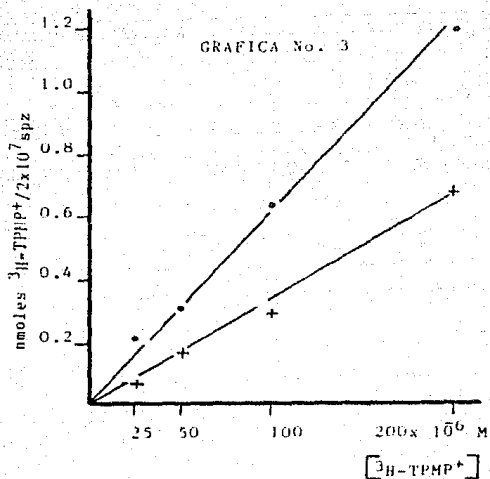
Al tratar los medios pobre- K^+ y rico- K^+ con va-



Efecto del número de espermatozoides sobre la acumulación de $^3\text{H-TPMP}^+$.

Los espermatozoides se incubaron en los medios pobre- K^+ (o--o) y rico- K^+ (x--x) durante 20 min a 37°C .

Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 6 determinaciones.



Efecto de la concentración de $^3\text{H-TPMP}^+$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron a 37°C durante 20 min en los medios pobre- K^+ (o-o) y rico- K^+ (x-x).

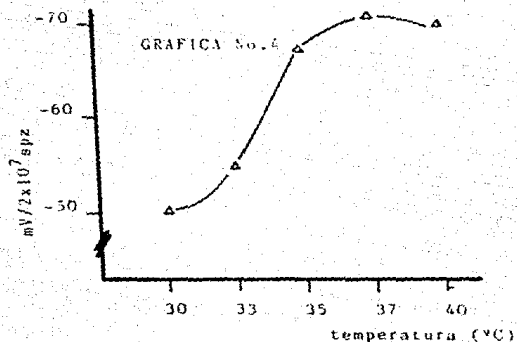
Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 6 determinaciones.

riaciones en el número de spz, se obtiene que la acumulación de TPMP⁺ es directamente proporcional con respecto al incremento del número de superficies expuestas en donde se llevará a cabo el intercambio entre el TPMP⁺ y las membranas espermáticas.

La hipótesis que podría describir el comportamiento debido a los cambios de concentración de TPMP⁺, es que la acumulación a través de la membrana del catión lipofílico es mediado por un proceso no saturable (a las concentraciones usadas), comprobándose que el TPMP⁺ difunde pasivamente a través de la membrana, ya que en caso de requerir de un transportador se ligaría el momento de su saturación, cosa que no se observa experimentalmente.

La temperatura óptima para efectuar el estudio de la determinación del $\Delta\psi$ en el spz humano resultó ser a 37°C, temperatura a la cual se presenta un máximo. (Gráfica 4).

La determinación del $\Delta\psi$ basado en la acumulación de TPMP⁺ en la membrana del spz humano es dependiente de la temperatura de incubación cosa que se observa claramente en la gráfica 4, ya que se presenta dificultad en la determinación del $\Delta\psi$ a temperaturas inferiores a ésta, posiblemente debido a las alteraciones en la configuración de las proteínas de membrana.



Efecto de la temperatura sobre el $\Delta\psi$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron durante 20 min a diferentes temperaturas.

El $\Delta\psi$ se calculó mediante la acumulación de $^3\text{H-TPMP}^+$ en el espermatozoide, como se describe en resultados.

Cada punto indica la media \pm la desviación estándar de 8 determinaciones.

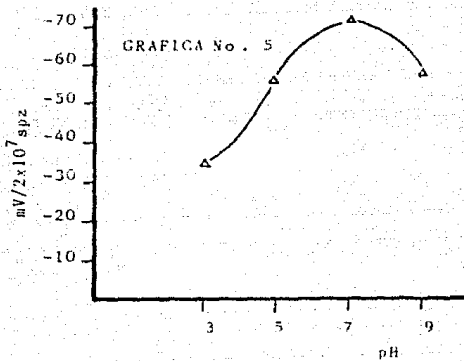
na provocando cambios en los dipolos que afectarán a sus funciones y por ende influenciarán así el valor - del $\Delta\Psi$.

También puede ser que la meseta alcanzada es debido a un estado de equilibrio entre el TPMP⁺ y el $\Delta\Psi$, éste último presenta pequeñas variaciones a temperaturas de 35° a 40°C.

Los cambios de pH en el medio de incubación nos permite medir las fluctuaciones del $\Delta\Psi$, mostrando - un pH óptimo de 7.0 y disminuyendo a ambos lados de - este valor. (Gráfica 5).

Cambios de pH en el medio conteniendo los spz alteran la estructura de la capa protéica de la membrana espermática, así como sus funciones. A bajo pH no hay evidencia de que trabaje la bomba electrogénica, por lo cual, la difusión de K⁺ se ve fuertemente afectada y por tanto el valor del $\Delta\Psi$ disminuye. También se puede suponer esta despolarización resultado de la interacción de la superficie negativa de la membrana con los protones del medio.

Viabilidad: ya que la viabilidad no fue modificada - por la incubación en los medios pobre-K⁺, rico-K⁺, la corrección por el número de células muertas en la determinación del $\Delta\Psi$ no tuvo que ser necesaria.



Efecto del pH sobre el $\Delta\psi$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron en los medios pobre- K^+ y rico- K^+ a $37^{\circ}C$ durante 20 min a los pH reportados.

Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 6 determinaciones.

Movilidad; en el porciento de los spz móviles se produce una disminución de un 25% a 30%, considerándose a estas células en condiciones para la determinación del $\Delta\Psi$.

Volumen intracelular; bajo las condiciones en que se trabajó (temperatura y tiempo), el volumen de agua atrapado en el paquete celular no excede de 3% al 5% del volumen total de la muestra.

El $^3\text{H}_2\text{O}$ intracelular mostró una función lineal con respecto al número de células espermáticas. Es importante señalar que el agua tritiada se equilibra en menos de 10 seg, manteniéndose durante el periodo largo de incubación (20 min) de las células, donde el sorbitol no penetra al interior de las células.

Utilizando las fórmulas descritas en Material y Métodos, se obtuvieron los siguientes valores:

Medio	Volumen intracelular
pobre- K^+	$182 \pm 0.04 \text{ nl}/2 \times 10^7 \text{ spz}$
rico- K^+	$174 \pm 0.03 \text{ nl}/2 \times 10^7 \text{ spz}$

Potencial eléctrico a través de la membrana ($\Delta\Psi$); los calculos para cuantificar el $\Delta\Psi$ se obtuvieron a partir de la acumulación de TPMP^+ en el spz, corregidos por la cantidad de TPMP^+ atrapado en el espacio -

intracelular, mediante la cantidad de ^{14}C -sorbitol medido en cada muestra, transformando a valores de concentración utilizando el volumen intracelular. Este valor es utilizado para calcular el $\Delta\psi$ usando la ecuación de Nernst como lo describe Lichtsktein¹⁵.

$$\Delta\psi = - \frac{R T}{Z P} \ln \frac{[\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{corregido}}}{[\text{TPMP}^+]_{\text{fuera}}}$$

Para calcular el gradiente de concentración de TPMP^+ es necesario determinar, bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas, el volumen intracelular de el spz, valores que anteriormente se tienen reportados. Para estas mediciones y considerando que el $\Delta\psi$ es nulo a concentraciones elevadas de K^+ , el componente de la acumulación total de TPMP^+ debido a el $\Delta\psi$ es aproximadamente:

$$[\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{pobre-K}^+} - [\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{rico-K}^+} = [\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{corregido}}$$

Este último valor dividido entre la concentración externa de TPMP^+ nos da la relación de concentración siguiente:

$$\frac{[\text{TPMP}^+]_{\text{dentro}}^{\text{corregido}}}{[\text{TPMP}^+]_{\text{fuera}}} = R_{\text{TPMP}^+}$$

La relación de concentración así calculada es constante en los rangos de TPMP⁺ utilizado.

El factor (TPMP⁺)_{dentro}^{pobre-K⁺} es el resultado de la acumulación de TPMP⁺ a través de la membrana del spz- así como a la acumulación en las membranas de los organelos intracelulares que manifiestan un potencial interno negativo.

El factor (TPMP⁺)_{dentro}^{rico-K⁺} es el gradiente de concentración de TPMP⁺ debido a la contribución de los organelos intracelulares como la mitocondria que manifiesta un potencial interno negativo.

Si se asume que el primer término de la ecuación de Nernst se mantiene constante dado que:

$$- 2.3 \left(\frac{RT}{ZF} \right) = - 61 \text{ mV}$$

Usando éste valor de -61 mV, se simplifica la fórmula a:

$$\Delta \Psi = - 61 \log R_{\text{TPMP}^+}$$

en donde se sustituirán los valores que se obtengan para R_{TPMP⁺}.

Usando el valor de -61 mV y el obtenido para

R_{TPMP^+} en la ecuación se obtiene:

$$\Delta\psi = - 69 \pm 2 \text{ mV}$$

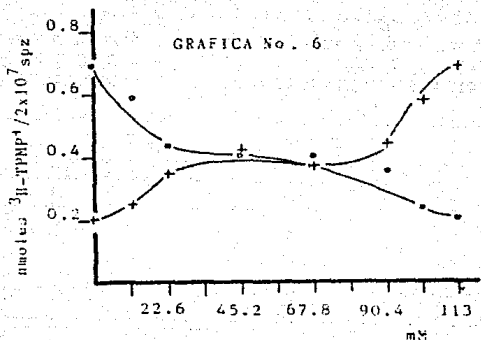
IV.2.- VARIACION DE CONDICIONES EXPERIMENTALES.

En la gráfica 6 se observa para el primer caso - (o--o), concentración de colina sustituida por K^+ , - una disminución paulatina en la acumulación de $TPMP^+$ en la medida que la concentración de colina es sustituida por K^+ .

Aumentando la concentración de K^+ y manteniendo la osmolaridad constante por la presencia de colina, - se obtiene una disminución en el $\Delta\psi$. Al elevarse - la concentración de K^+ en el medio de incubación la - difusión a través de la membrana plasmática K^+ dentro - $\rightarrow K^+$ fuera se ve disminuida drásticamente provocando una despolarización. Sin embargo se registra cierta acumulación de $TPMP^+$ ya que existen superficies negativas de membranas de organelos intracelulares que no son afectados por la adición exterior de K^+ .

Cuando se sustituye el K^+ por Na^+ en el medio de incubación (x--x) se podrá notar que la acumulación - de $TPMP^+$ aumenta gradualmente. (Gráfica 6).

Para el caso en que se va aumentando la concen-



Efecto de la concentración externa de Na^+ y K^+ sobre la acumulación de $^3\text{H-TPMP}^+$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron a 37°C durante 20 min en presencia de colina y K^+ (o--o) y de K^+ y Na^+ (x--x) ambos a una concentración final de 113 mM.

Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 6 determinaciones.

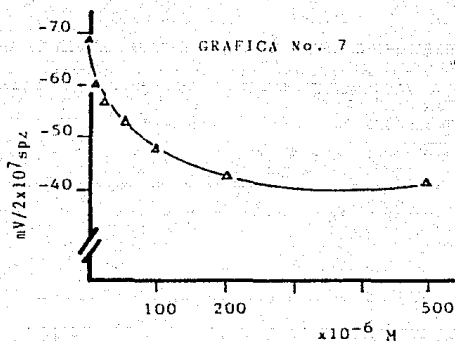
tración de Na^+ , la acumulación de TPMP⁺ se ve favorecida debido a que el Na^+ difundirá al interior de la célula provocando un desequilibrio iónico que activará la acción electrogénica, la cual tratará de equilibrar este sistema mediante la difusión de K^+ que participa en la hiperpolarización del $\Delta\psi$.

Las observaciones anteriores sugieren la contribución de la enzima ATPasa(Na^+/K^+) en el mantenimiento del gradiente de concentración Na^+/K^+ y su íntima relación con el $\Delta\psi$ del spz.

Cuando hay variaciones en las concentraciones de los iones Na^+ y K^+ en el medio de incubación, se tiene que aproximadamente entre 34 y 80 mM el $\Delta\psi$ resultante es debido a la contribución de ambos iones.

La presencia de la ouabafina en el medio de incubación induce un decremento en el $\Delta\psi$ del spz hasta de un 42% (Gráfica 7).

La ouabafina provoca una despolarización en el $\Delta\psi$ presumiblemente debido al colapso que sufre el gradiente Na^+/K^+ , resultado de la inhibición en la difusión de K^+ hacia el exterior de la membrana, función que desempeña la enzima ATPasa la cual se encuentra bloqueada funcionalmente por la presencia de la ouabafina en el medio de incubación. Los cambios en -



Efecto de la ouabaina sobre el $\Delta\Psi$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron en los medios pobre- K^+ y rico- K^+ durante 20 min a 37°C , en presencia de ouabaina (—). El $\Delta\Psi$ se calculó como se describe en resultados.

Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 5 determinaciones.

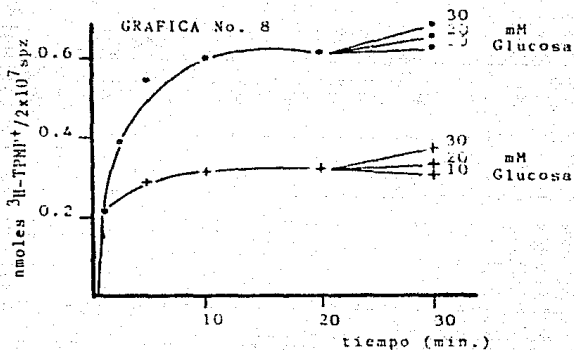
el $\Delta\psi$ así obtenidos, nos sugieren la contribución de la enzima ATPasa($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) una vez más. Se involucra - así la bomba electrogénica en el mantenimiento del $\Delta\psi$ en el spz humano.

La incubación de los spz en el medio conteniendo glucosa induce un incremento en la acumulación de TPMP⁺, sin embargo al adicionar a diferentes concentraciones en el estado de equilibrio, esta acumulación del catión lipofílico no fue significativamente modificada. (Gráfica 8).

El transporte de glucosa a través de la membrana es permitido por el potencial eléctrico de la célula y éste último a su vez, depende del gradiente iónico. Esta relación nos indica que la concentración de glucosa influye en el transporte de K^+ favoreciendo la pequeña hiperpolarización observada.

La adición de valinomicina al sistema de incubación registra un incremento en el valor de $\Delta\psi$. (Tabla 5).

Se reconoce que en la membrana existen diferentes sistemas enzimáticos los cuales se ven afectados en la presencia de valinomicina, antibiótico que actúa sobre la membrana haciéndola permeable para el K^+ ; por lo que la difusión de éste ion tanto a nivel-



Efecto de la glucosa sobre la acumulación de $^3\text{H-TPMP}^+$ en el espermatozoide humano.

Los espermatozoides se incubaron en los medios pobre- K^+ (o--o) y rico- K^+ (x--x) a 37°C , cuando se logra el estado de equilibrio (20 min), se adiciona glucosa a diferentes concentraciones.

Cada punto indica la media \pm la desviación estandar de 6 determinaciones.

de membrana plasmática y mitocondrial producirá hiperpolarización.

Por último la presencia de Ca^{++} en el medio exterior, induce un incremento en la acumulación de $TPMP^+$ y por consiguiente en el $\Delta\Psi$. (Tabla 5).

La elevada concentración de Ca^{++} en el medio de incubación, favorece la entrada del Ca^{++} a la célula afectando considerablemente el transporte de K^+ , provocando un sedequilibrio iónico que activará la bomba electrogénica que a su vez difundirá K^+ al exterior de la célula produciendo una hiperpolarización.

TABLA 5.- VALORES DE $\Delta\psi$ OBTENIDOS PARA ALGUNOS AGENTES.

AGENTE	CONC.	mV/2x10 ⁷ spz	CAMBIO EXPRESADO EN %
- - (8)	0 mM	-69±2.0	0
Valinomicina (8)	10 mM	-82±2.0	+20
Ca ⁺⁺ (8)	5 mM	-76±1.8	+10

(8): Número de determinaciones.

V. CONCLUSIONES

V.1.- La conjugación adecuada de las condiciones experimentales de tiempo, número de espermatozoides, concentración a la que se utilizó el TPMP⁺, temperatura y pH; permitieron determinar el $\Delta\psi$ en el spz humano eyaculado, sin que esta célula se viera afectada en forma apreciable.

V.2.- El uso del ion lipofílico TPMP⁺ como una medida indirecta del $\Delta\psi$, basada en la característica de distribuirse libremente a ambos lados de la membrana, proporciona valores que sustituidos en la ecuación de Nernst se obtiene un valor para el spz humano de

$$\Delta\psi = - 69 \pm 2 \text{ mV.}$$

V.3.- En este trabajo se reafirma el concepto de que constituyentes de la membrana intervienen en importantes funciones para la regulación del $\Delta\psi$, indicando que el valor obtenido de éste, resulta de la difusión de K⁺ hacia el exterior de la célula, esto es, K⁺ dentro \longrightarrow K⁺ fuera, difusión que no solo se lleva a cabo en membrana plasmática, sino también en membranas de organelos intracelulares.

V.4.- Los gradientes Na⁺/K⁺ involucrados en los cambios de la acumulación de TPMP⁺ sugieren la participación de la enzima ATPasa(Na⁺-K⁺) como principal regu-

lador del transporte de estos iones a través de la -
membrana y por ende participante activa en el valor -
del $\Delta\psi$.

V.5.- Los resultados obtenidos por la adición de -
ouabaina, valinomicina y Ca^{++} confirman la participa-
ción de la enzima ATPasa($Na^{+}-K^{+}$), sugiriendo que el -
 $\Delta\psi$ es K^{+} -dependiente.

VI.- REFERENCIAS

- 1.- Auichi Toshihiro, et al, (1984), "Effect of glucose and pyruvate metabolism on membrane potential in synaptosomes", *Biochimica et Biophysica*, 771: 228-234.
- 2.- Ballesteros L.M., et al, (1983), "Effect of steroid hormones on membrane sugar transport in human spermatozoa", *Archives of Andrology*, 11:95-100.
- 3.- Boxman A.W., et al, (1982), "Some characteristic of tetraphenylphosphonium uptake into *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochimica et Biophysica*, 686: 13-18.
- 4.- Calzada Leobardo, et al, (1988), "Efecto de hormonas esteroides sobre capacitación y potencial de membrana de espermatozoide humano", Unidad de Investigación Clínica IMSS.
- 5.- Calzada Leobardo, et al, (1988), "Hiperpolarización y despolarización en la membrana del espermatozoide humano", Unidad de Investigación Clínica IMSS.
- 6.- Calzada Leobardo, et al, (1988), "Contribución al potencial de membrana de la ATPasa(Na^+ - K^+) en el espermatozoide humano", Unidad de Investigación Clínica IMSS.

- 7.- Delgado N.M., et al, (1982), "Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane", Archives of Andrology, 8:87-95.
- 8.- Fawcett W. Don, (1958), "The structure of the mammalian spermatozoa", International Review of Cytology, 7:195-232.
- 9.- Felber M. Suzane, et al, (1982), "Factors determining the plasma-membrane potential of lymphocytes", Biochem J., 204:577-585.
- 10.- Gallo L. Richard, et al, (1984), "Characterization of the plasma and mitochondrial membrane potential of alveolar type II cells by the use of ion probes", Biochimica et Biophysica Acta, 771:217-227.
- 11.- Glynn I.M., et al, (1975), "The sodium pump", Glynn & Karlsh, 1122:13-55.
- 12.- Hafez E.S.E, "Sperm Transport", National Institute of child health and human development, 143-174.
- 13.- Komor Edwald, et al, (1976), "The determination of the membrane potential of chlorella vulgaris. Evidence for electrogenic sugar transport", Eur J. Biochem, 70:197-204.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 14.- Korchak H.M., et al, (1978), "Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic responses to surface stimulation", - *Biology Cell*, 75:3818-3822.
- 15.- Lacko L., et al, (1972), "The pH dependence of exchange transport of glucose in human erythrocytes", *J. Cell Physical*, 80:73-78.
- 16.- Lichtsktein D., et al, (1979), "Use of a lipophilic cation for determination of membrane potential in neuroblastoma-glioma hybrid cell suspensions", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, - 76:650.
- 17.- Mercado E., et al, (1973), "Structural properties of the membrane of intact human spermatozoa. A study with fluorescent probes", *Biochimica et Biophysica Acta*, 298:639-652.
- 18.- Morris Gareth J., "Fisicoquímica para biólogos". Reverte, México, 245 (1982).
- 19.- Peterson N. Rudolph, et al, (1978), "Use of a fluorescent dye to measure drug-induced changes in the membrane potential boar spermatozoa", - *Life Science*, 22:659-666.
- 20.- Ramos Sofia, et al, (1979), "Effect of tetanus toxin on the accumulation of the permeant lipids

- philic cation tetraphenylphonium by guinea pig -
brain synaptosomes", *Biochemistry*, 75:4783-4787.
- 21.- Reyes Alejandro, et al, (1975), "Maduración epididimaria del espermatozoide y modulación de la fertilidad en el hombre", *Ginecología y Obstetricia de México*, 37:53-67.
- 22.- Reys A., et al, (1981), "Interference with epididymal physiology as possible site of male contraception", *Archives of Andrology*, 7:159-168.
- 23.- Robertis, "Biología celular y molecular", El Ateneo, México, 103: (1986).
- 24.- Rosado Adolfo, et al, (1973), "Cell polarography II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa", *Fertility and Sterility*, 24:349-354.
- 25.- Sauvet Remy, et al, (1979), "Interaction of divalent cations with negatively charged membrane-surfaces I. Discrete charge potential", *J. Theor Biol*, 81:157-179.
- 26.- Singer S.J., et al, (1972), "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes", *Science*, 175:720-731.
- 27.- Taglietti Vanni, (1979), "Early electrical responses to fertilization in sea urchin eggs", *Exp Cell Res*, 120:448-451.

- 28.- Velázquez Anselmo, et al, (1972), "Cell potato-
graphy I. Study of the surface characteristics -
of human spermatozoa", Fertility and Sterility, -
23:562-567.
- 29.- Vial Mc Grady, et al, (1972). "Cationic influen-
ces on sperm biopotentials", Experimental Cell -
Research, 73:192-196.
- 30.- Yanagimachi R., "Epididimal maturation and capa-
citation of spermatozoa. Mechanisms of fertiliza-
tion in mammals", 83-88.
- 31.- Zieler K., et al, (1981), "Effects of peptide -
hormones and andrenergic agents on membrane po--
tentials of target cells", Federation Prod, 40:
121-124.