



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11281

16
2ej

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

Estudio de las vías de movilización de calcio
intracelular en células espermategénicas
aisladas del testículo del ratón

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

Celia María / Santi Grau Pérez

Asesores: Dr. Alberto Darszon Israel
Dr. Arturo Hernández - Cruz

México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264492



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 esta 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.

A Arturo, mi compañero en este largo camino.

A mis padres.

A Daniel y Gabriela.

A Doña Eulalia y Don Arturo.

A mis queridos amigos de aquí y de allá,

*A todos ellos por su cariño y su constante aliento,
los cuales han sido ingredientes fundamentales
para llevar a cabo esta tarea .*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de varias personas e instituciones.

En primer lugar quiero agradecer profundamente a mis tutores: Alberto y Arturo por su constante apoyo, entusiasmo, asesoramiento, comprensión y por la confianza depositada en mí durante todo este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dres. Francisco J. Alvarez-Leefmans y Agustín Guerrero por su valiosa orientación y guía.

A los miembros del jurado Dres.: Adolfo García Sainz, Marcia Hiriart, Jaime Mas, Lourival Possani y Luis Vaca; por la corrección de la tesis y sus sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio del 206 Ote. y de Cuernavaca por soportarme durante todo este tiempo. Especialmente quiero agradecer a Teresa Santos por su valiosa colaboración técnica.

A todos los compañeros del Dpto. de Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República en Uruguay (incluidos, Eduardo Ríos y Eduardo Mizraji) por transmitirme su enorme entusiasmo por las Ciencias Básicas, en especial por la Biofísica, y por apoyarme en mis primeros pasos.

Para la realización de este proyecto y para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biomédicas recibí una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA).

RESUMEN

Las variaciones de concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) constituyen señales muy importantes para la división, diferenciación y maduración celular. Es muy probable que éstas también sean importantes para la espermatogénesis, proceso de diferenciación y maduración comparativamente poco estudiado, y llevado a cabo exclusivamente por las células germinales masculinas. Por otro lado, tanto la capacitación como la reacción acrosomal (RA), procesos necesarios para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo, requieren de elevaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ y del pH_i . Numerosas evidencias indican la participación de por lo menos dos vías de entrada de Ca^{2+} diferentes durante la RA en espermatozoides de invertebrados y de mamíferos. Una de las mismas estaría modulada por el pH_i . Poco se sabe sobre las vías de entrada de Ca^{2+} a estas células y su modulación. Esto se debe a que las características del espermatozoide determinan formidables dificultades experimentales de diversa índole. Por estas razones decidimos tomar como modelo a las células espermatogénicas, en sus etapas más avanzadas de maduración, para estudiar aspectos relevantes de la fisiología del espermatozoide, como los flujos iónicos que se producen a través de la membrana. En este trabajo de tesis se describen por primera vez, en células espermatogénicas aisladas de testículo de ratón adulto, dos vías de entrada de Ca^{2+} con características diferentes: una regulada por el pH_i y otra que tiene las características de un canal de Ca^{2+} dependiente del potencial. De estar presentes en el espermatozoide maduro ambas podrían participar en forma crucial en los procesos de capacitación y/o en la reacción acrosomal.

En las células espermatogénicas aisladas, cargadas con el indicador fluorescente de pH BCECF-AM, la aplicación breve (30-60 s) de 25 mM de NH_4Cl produce un aumento de pH_i de alrededor de 1.3 U desde un pH_i basal de ≈ 6.65 , alcanzándose una meseta que se mantiene durante la aplicación del NH_4Cl sin mostrar acidificación de rebote. Cuando las células se incuban con Fura-2-AM, para medir los cambios de $[Ca^{2+}]_i$, esta alcalinización produce una respuesta bifásica caracterizada por una caída inicial de la $[Ca^{2+}]_i$, seguida de un aumento de la misma. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ resulta mayoritariamente de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana con una contribución poco significativa de los reservorios intracelulares. Estos transitorios de Ca^{2+} se facilitan luego de varias aplicaciones sucesivas de NH_4Cl , obliterando paulatinamente la caída inicial en la

[Ca²⁺]_i. Esta vía de permeación de Ca²⁺ sensible al pH_i permite además el pasaje de otros cationes divalentes, como bario, estroncio y manganeso. Además se bloquea con cobalto y níquel, pero no con nifedipina. La magnitud de los transitorios de Ca²⁺ producidos por la alcalinización intracelular aumenta a medida que avanza la maduración. Las respuestas más grandes se registraron en espermatozoides testiculares. La extrapolación de estos resultados indica que esta vía de entrada de Ca²⁺ podría tener un papel importante en la fisiología del espermatozoide maduro, produciendo al menos una parte del influjo de Ca²⁺ necesario para iniciar la RA.

Utilizando la técnica de fijación de voltaje en célula completa también encontramos en estas células una corriente de Ca²⁺ dependiente del potencial con las características biofísicas de un canal de tipo T. Estos canales de Ca²⁺ tipo T no parecen contribuir en el transitorio de Ca²⁺ inducido por la alcalinización intracelular dado que sus propiedades biofísicas no se alteran mayormente con la alcalinización intracelular y tienen una farmacología distinta a la del transitorio de Ca²⁺. Además de afectarse por los bloqueadores típicamente empleados (níquel y amilorida), este canal se bloquea con nifedipina (μM) en el mismo rango de concentraciones en que esta droga bloquea la RA. Las características de este canal de Ca²⁺ hacen pensar que de estar presente en el espermatozoide maduro también podría contribuir a la entrada de Ca²⁺ requerida para iniciar la RA. Las dos vías de entrada de Ca²⁺ descritas en este trabajo podrían estar involucradas además en los flujos transmembranales de Ca²⁺, relevantes para los procesos de división, diferenciación y maduración que tienen lugar durante la espermatogénesis.

SUMMARY

Rises of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) are key signals for cell division, differentiation and maturation. Similarly, they are likely to be important for the unique processes of meiosis and spermatogenesis, carried out exclusively by male germ cells. In addition, elevations of $[Ca^{2+}]_i$ and intracellular pH (pHi) in mature sperm trigger at least two events obligatory for fertilization: capacitation and acrosome reaction (AR). Evidence implicate the activity of at least two Ca^{2+} channels, one modulated by pHi, in the origin of these Ca^{2+} elevations, but their nature remains unexplored, in part because work in individual spermatozoon are hampered by formidable experimental difficulties. Recently, late spermatogenic cells have emerged as a model system for studying aspects relevant for sperm physiology, such as plasmalemmal ion fluxes. Here we describe the first study on the influence of controlled intracellular alkalinization on $[Ca^{2+}]_i$ on identified spermatogenic cells from mouse adult testis. In BCECF-AM-loaded spermatogenic cells, a brief (30-60 s) application of 25 mM NH_4Cl increased pHi by about 1.3 units from a resting pHi \sim 6.65. A steady pHi plateau was maintained during NH_4Cl application, with little or no rebound acidification. In fura-2-AM loaded cells, alkalinization induced a biphasic response composed of an initial $[Ca^{2+}]_i$ drop followed by a 2-3 fold rise. Maneuvers that inhibit either Ca^{2+} influx or intracellular Ca^{2+} release demonstrated that the majority of the Ca^{2+} rise results from plasma membrane Ca^{2+} influx, albeit a small component likely to result from intracellular Ca^{2+} release was occasionally observed. Ca^{2+} transients potentiated with repeated NH_4Cl applications, gradually obliterating the initial $[Ca^{2+}]_i$ drop. The pH-sensitive Ca^{2+} permeation pathway allows the passage of other divalents (Sr^{2+} , Ba^{2+} and Mn^{2+}) and is blocked by inorganic Ca^{2+} channel blockers (Ni^{2+} and Cd^{2+}), but not by the organic blocker nifedipine. The magnitude of these Ca^{2+} transients increased as maturation advances, with the largest responses being recorded in testicular sperm. By extrapolation, these findings suggest that the pH-dependent Ca^{2+} influx pathway could play significant roles in mature sperm physiology. Its pharmacology and ion selectivity suggests that it corresponds to an ion channel different from the voltage-gated T-type Ca^{2+} channel also present in spermatogenic cells. We postulate that the Ca^{2+} permeation pathway regulated by pHi, if present in mature sperm,

may be responsible for the dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} influx required for initiating the AR and perhaps other important sperm functions.

Using the whole cell patch-clamp technique we also found that the only voltage-gated Ca^{2+} channels (VDCC) present in spermatogenic cells belong to the family of T-type Ca^{2+} currents. These T-type Ca^{2+} channels do not contribute significantly in the alkalinization-induced Ca^{2+} transient since their biophysical properties are not greatly affected by internal alkalinization and their pharmacology differ from the one of the calcium transient. These VDCC are blocked by amiloride and nickel. If these channels are present in mature sperm, it is likely that they play an important role in the acrosome reaction. This notion is supported by the fact that these channels are blocked by nifedipine in the same range of concentration that blocks the acrosome reaction.

Both of these Ca^{2+} entry pathways are also likely to participate in regulating meiotic cell division and sperm differentiation.

INDICE

I Introducción	4
Generalidades del proceso de fecundación.....	4
Morfología del espermatozoide.....	5
Propiedades funcionales.....	6
Maduración.....	7
Capacitación.....	7
Reacción acrosomal.....	10
-Reacción acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar.....	11
-Reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero.....	14
Espermatogénesis.....	20
-Mitosis.....	21
-Meiosis.....	21
-Espermiogénesis.....	21
II Objetivos	23
Objetivo General.....	23
Objetivos particulares.....	24
III Material y métodos	26
a) Obtención de las células espermatoogénicas.....	26
b) Identificación de los diferentes tipos celulares.....	27
c) Medición de la concentración de Ca^{2+} intracelular.....	28
d) Mediciones del pH intracelular.....	30
e) Procedimiento de alcalinización intracelular.....	33
f) Registros electrofisiológicos.....	33

IV Resultados	37
<u>Parte A: Cambios en el pHi y transitorios de Ca²⁺ inducidos por la alcalinización intracelular en células espermatozógenas</u>	37
-Cambios en el pHi producidos durante la aplicación de NH ₄ Cl.....	37
-Cambios en la concentración de Ca ²⁺ intracelular inducidos por la alcalinización intracelular.....	38
- umbral de pH y facilitación uso-dependiente del aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular.....	41
-Origen del aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular.....	43
-Permeación a través de la vía de influjo de Ca ²⁺ sensible a pH.....	46
-Inhibidores de la vía de influjo de Ca ²⁺ sensible a pH.....	48
<u>Parte B: Correlato electrofisiológico: Canales de Ca²⁺ dependientes del voltaje en células espermatozógenas</u>	51
-Características de las corrientes entrantes presentes en las células espermatozógenas.....	51
-Cinéticas de activación e inactivación de las corrientes de Ca ²⁺	53
- Dependencia del voltaje de la activación y la inactivación en estado estacionario.....	54
-Cinética de deactivación.....	56
-Recuperación de la inactivación.....	57
-Efecto de bloqueadores de canales de Ca ²⁺	57
-Efecto de la alcalinización intra y extracelulares.....	59
V Discusión	63
Ca ²⁺ y pHi como segundos mensajeros intracelulares.....	63
Uso de las células espermatozógenas como modelo del espermatozoide.....	67
Parte A) Vía de influjo de Ca ²⁺ activada por la alcalinización intracelular.....	68

-Origen de los aumentos de la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por la alcalinización intracelular: posibles mecanismos involucrados.....	68
-Papel fisiológico de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización intracelular.....	80
Parte B: Canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje de las células espermatozógenas.....	83
-Características generales.....	83
-Posible participación de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje en la Reacción acrosomal.....	87
-Posible participación de las corrientes de Ca^{2+} dependientes del voltaje en la diferenciación y maduración de las células espermatozógenas.....	90
VI Conclusiones.....	93
VII Perspectivas.....	94
VIII Referencias.....	95

I INTRODUCCION

La fecundación es uno de los procesos biológicos más importantes dado que permite tanto la generación de un nuevo individuo, como la preservación de las especies. Este proceso requiere la interacción de los gametos femenino y masculino completamente maduros entre sí y con su cambiante entorno. El medio ambiente en el que se encuentran ambos gametos permite su desarrollo y maduración y a la vez determina la supervivencia de aquellos con mayor potencial para la fecundación.

Ciertas señales químicas emitidas por el óvulo influyen en la función espermática permitiendo una adecuada interacción entre ambos gametos. Si bien muchos de los factores mediadores de la interacción espermatozoide-óvulo se han estudiado desde hace un siglo (Lille, 1919), muchos de los detalles moleculares involucrados en estos eventos (señales químicas y elementos de respuesta a las mismas) permanecen aún sin aclararse.

Cada vez más evidencias sugieren la participación de canales iónicos en estos procesos. Ciertos cambios en la composición iónica del medio, así como bloqueadores de los canales iónicos inhiben eventos fundamentales del proceso de fecundación tales como, la motilidad, maduración del espermatozoide y la reacción acrosomal (RA). Se ha demostrado que el flujo de iones particularmente del calcio (Ca^{2+}) a través de la membrana plasmática participa en forma crucial en los eventos que conducen a la fecundación. Aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales las proteínas de membrana responsables de estos flujos iónicos operan en la fisiología del espermatozoide. También queda mucho por explorar en lo concerniente a su posible modulación por factores provenientes de su entorno y por señales provenientes del óvulo. Estudiar los canales iónicos del espermatozoide no es tarea fácil debido a que sus características dificultan mucho el uso de algunas técnicas electrofisiológicas convencionales, como la fijación del voltaje en célula completa. Por otra parte, el uso de la biología molecular como herramienta para acceder a un mayor conocimiento de los canales iónicos requiere de la síntesis activa de dichas proteínas, cosa que no ocurre en el espermatozoide por tratarse de una célula diferenciada terminal. Tomando en cuenta estas limitaciones, en este trabajo decidimos abordar el estudio de los canales iónicos del espermatozoide empleando como

modelo sus precursores inmediatos: las células espermatogénicas en sus etapas de maduración más avanzadas, suponiendo que, los canales relevantes para el proceso de fecundación en el espermatozoide maduro, probablemente también están presentes en sus células precursoras inmediatas.

Este proyecto está enfocado al estudio de los canales iónicos presentes en las células espermatogénicas y a su posible participación en la fisiología del espermatozoide. A su vez se discutirá también el posible papel de dichos canales en el proceso de maduración y proliferación de las células espermatogénicas.

En particular, en el trabajo se examinaron las propiedades de dos vías de permeación de Ca^{2+} presentes en las células espermatogénicas de ratón, de donde se deduce su posible participación tanto en los procesos de maduración y diferenciación de estas células, así como su papel en la fecundación.

Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula extremadamente especializada destinada a encontrar al óvulo, fusionarse con él y depositar en su interior la información genética. Desde el punto de vista morfológico consta principalmente de la cabeza y el flagelo.

Cabeza. La forma de la cabeza varía entre las diferentes especies debido a las diferentes formas del núcleo. En general la forma de la cabeza se puede clasificar en 2 grandes tipos: 1) *espatuladas*, las cuales son aplanadas, piriformes o con forma de raqueta; y 2) las *falciformes* las cuales son elongadas, curvas y puntiagudas, un ejemplo de éstas es la del espermatozoide de ratón. La cabeza está ocupada en su mayor parte por el núcleo y el acrosoma. El acrosoma es una estructura membranosa que se encuentra en la parte anterior de la cabeza, rodeando parcialmente al núcleo, y que contiene gran cantidad de enzimas líticas (incluyendo fosfatasa ácida), carbohidratos y glicoproteínas, que cuando se liberan permiten al espermatozoide penetrar las capas más externas del óvulo.

Flagelo. Su longitud varía considerablemente entre las diferentes especies (190 μM en la rata y 60 μM en el humano). Consta de 4 regiones denominadas pieza de conexión o cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal, (fig. 1).

Cuello: es un segmento corto compuesto por material electrodense que rodea cavidades vacías que en algunos casos contienen restos de los centriolos.

Pieza media: incluye el axonema, el cual está constituido por microtúbulos con una disposición característica de 9 dobletes periféricos y 2 túbulos en el centro. También allí se encuentran 9 fibras densas externas, mitocondrias elongadas y una fina capa de citoplasma delimitada por la membrana plasmática.

Pieza principal: consta del axonema y 7 fibras densas externas que van disminuyendo de calibre. Las fibras 8 y 9 han sido sustituidas por columnas longitudinales de tejido fibroso.

Pieza terminal: está compuesta por elementos del axonema desorganizados distalmente, una fina capa de citoplasma y la membrana plasmática. Entre la pieza media y la principal existe un engrosamiento del citoplasma asociado a la membrana plasmática denominado anillo (annulus) (ver fig. 1).

Exceptuando las mitocondrias, ninguno de los organelos citoplasmáticos habituales (ej. Golgi, retículo endoplásmico (RE), centriolos) están presentes en el espermatozoide. No obstante, los organelos presentes en estas células tan especializadas son derivados de los anteriores: así, el acrosoma se deriva del RE-Golgi, el axonema de uno de los centriolos y los elementos del citoesqueleto se producen durante la espermiogénesis como resultado de la biosíntesis en polisomas (Clermont y col., 1993).

Propiedades funcionales del espermatozoide: fecundación

Los espermatozoides de mamífero que se liberan en los túbulos seminíferos del testículo no son capaces de fecundar al óvulo. Para poder hacerlo éstos deben sufrir cambios estructurales y funcionales que involucran tres procesos:

- A) Maduración
- B) Capacitación
- C) Reacción Acrosomal

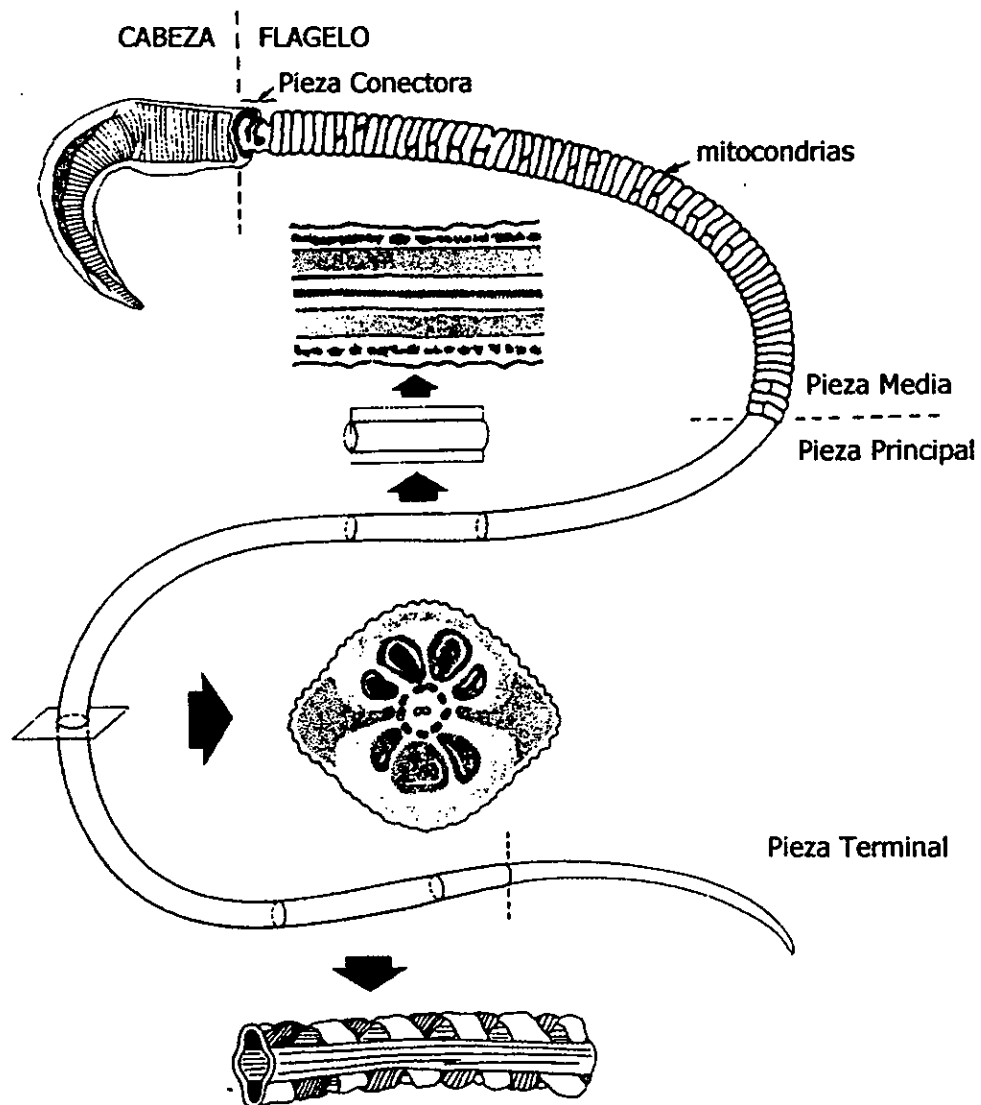


Fig. 1 Estructura del espermatozoide de mamífero. La cabeza contiene el núcleo y el acrosoma mientras que el flagelo contiene las mitocondrias, axonema, fibras densas externas, y la cubierta fibrosa. (tomado de Eddy, E.M. *The physiology of Reproduction*, Knobil, E. y Neill, ., Eds, Raven Press, New York, 1988, 27).

A) Maduración

La maduración del espermatozoide se lleva a cabo en el epidídimo. Uno de los cambios que más se destacan durante la maduración es la aparición de la motilidad. Los espermatozoides testiculares son inmóviles o muy poco móviles. La morfología de núcleo no cambia pero se produce una estabilización de la cromatina debido a la formación de puentes disulfuro. La membrana plasmática del espermatozoide es el sitio en el cual se producen los mayores cambios. Durante su pasaje por el epidídimo algunas de las moléculas que se encuentran adsorbidas a la membrana plasmática se pierden o son alteradas a la vez que nuevas moléculas, generalmente glicoproteínas, son adsorbidas. También se producen modificaciones en las glicoproteínas preexistentes y se agregan nuevas glicoproteínas a la membrana plasmática. Asimismo se producen cambios en la composición lipídica de la membrana, tales como el aumento de su contenido de colesterol. Estos cambios en la composición de la membrana ocurren tanto en la cabeza como en el flagelo (Yanagimachi, 1988) (fig. 2).

B) Capacitación

Los espermatozoides de mamífero maduros y eyaculados no son aún capaces de fecundar al óvulo. Para ser capaces de hacerlo deben permanecer cierto tiempo en el aparato genital femenino o ser incubados en condiciones iónicas especiales, (Florman, y Babcock, 1991). El proceso que tiene lugar en estas condiciones se denomina capacitación.

La capacitación es un proceso mal comprendido, que se presenta sólo en los mamíferos y que consiste, al menos en parte, en la remoción del material que rodea la superficie del espermatozoide sobre todo a nivel del acrosoma (en su mayor parte glicoproteínas de membrana). Esto da como resultado la exposición de las proteínas señalizadoras o receptores membranales que permiten al espermatozoide bien interactuar con receptores específicos del óvulo o responder a señales químicas provenientes del óvulo para llevar a cabo posteriormente la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1988).

En las especies en las cuales el semen se deposita directamente en el útero durante el coito, (ej. los roedores), el principal sitio de capacitación es el oviducto. En el humano, la capacitación comienza al atravesar el mucus cervical, continúa en el útero y se completa en el oviducto.

El tiempo mínimo de capacitación (preincubando los espermatozoides en el tracto genital femenino o en un medio artificial y midiendo el tiempo en que posteriormente demoran en fecundar al óvulo) es de 1 hora, en el caso del espermatozoide de ratón.

Capacitación in vitro: En 1963 Yanagimachi y Chang reportaron por primera vez que los espermatozoides se pueden capacitar *in vitro* (Yanagimachi y Chang, 1963). El medio comunmente usado para capacitar a los espermatozoides *in vitro* es una solución Tyrode modificada o Krebs-Ringer suplementado con fuentes apropiadas de energía (glucosa, lactato, piruvato) y albúmina. También se utilizan con frecuencia medios de cultivo comerciales como el Ham o F-10 suplementados con suero.

Cambios que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación:

a) Cambios estructurales.

En esta etapa se produce la remoción de glicoproteínas y proteínas periféricas de membrana, quedando expuesto el receptor al óvulo. Aparecen además nuevos antígenos de superficie. Asimismo se produce una disminución del contenido en colesterol de la membrana plasmática y un reordenamiento de las proteínas de membrana (ver fig. 2)

b) Cambios funcionales.

Motilidad.

Durante la maduración y la capacitación se produce un aumento muy evidente de la $[Ca^{2+}]_i$ que llevan al espermatozoide a un estado de hipermotilidad (White y Atken, 1989).

Cambios en el pHi

Durante la capacitación se han descrito aumentos de pHi en los espermatozoides de hamster, bovino y ratón (Meizel y Deamer, 1978; Vredenburg y Parrish, 1995; Zeng y col., 1996). Los espermatozoides pierden la capacidad de ser capacitados cuando se impide dicha alcalinización. Las consecuencias funcionales de la capacitación, incluyendo la reacción acrosomal, dependen de la elevación del pHi, el cual es regulado por un mecanismo de transporte Na^+ , Cl^- , HCO_3^- (Florman y col., 1996).

Cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+}

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta durante el proceso de capacitación *in vitro* de espermatozoides humanos alcanzando una fase de meseta en 90-120 minutos (Baldi y col., 1991; DasGupta y col., 1993). Según Fraser y col. (1987) se requiere una concentración mínima de Ca^{2+} de 90 μM para la capacitación de espermatozoides de ratón, lo cual sugiere que el influjo de Ca^{2+} es importante. No está claro el papel que desempeñan los reservorios intracelulares de Ca^{2+} en el proceso de capacitación. En el acrosoma de varias especies de espermatozoides de mamífero, se han detectado, la calreticulina (proteína que une Ca^{2+}) (Nakamura y col., 1993) y receptores de IP_3 (Walensky y Snyder, 1995; Treviño y col., 1998), lo cual indica que el Ca^{2+} puede almacenarse en este organelo. En este sentido, la tapsigargina, la cual favorece la liberación de Ca^{2+} de estos reservorios, parece acelerar el proceso de capacitación (Mendoza y Tesarik, 1993).

Cambios del potencial de membrana.

Mediante el uso de colorantes sensibles a los cambios del potencial de membrana, Zeng y col. reportaron que durante la capacitación se produce una hiperpolarización en los espermatozoides de toro y de ratón. Esta hiperpolarización está ausente cuando los espermatozoides se incuban en medios no capacitantes. En espermatozoides de ratón no capacitados estos autores reportan un potencial de reposo de -30 mV, mismo que alcanza -50 mV en los capacitados. Durante la capacitación se produce un aumento de la

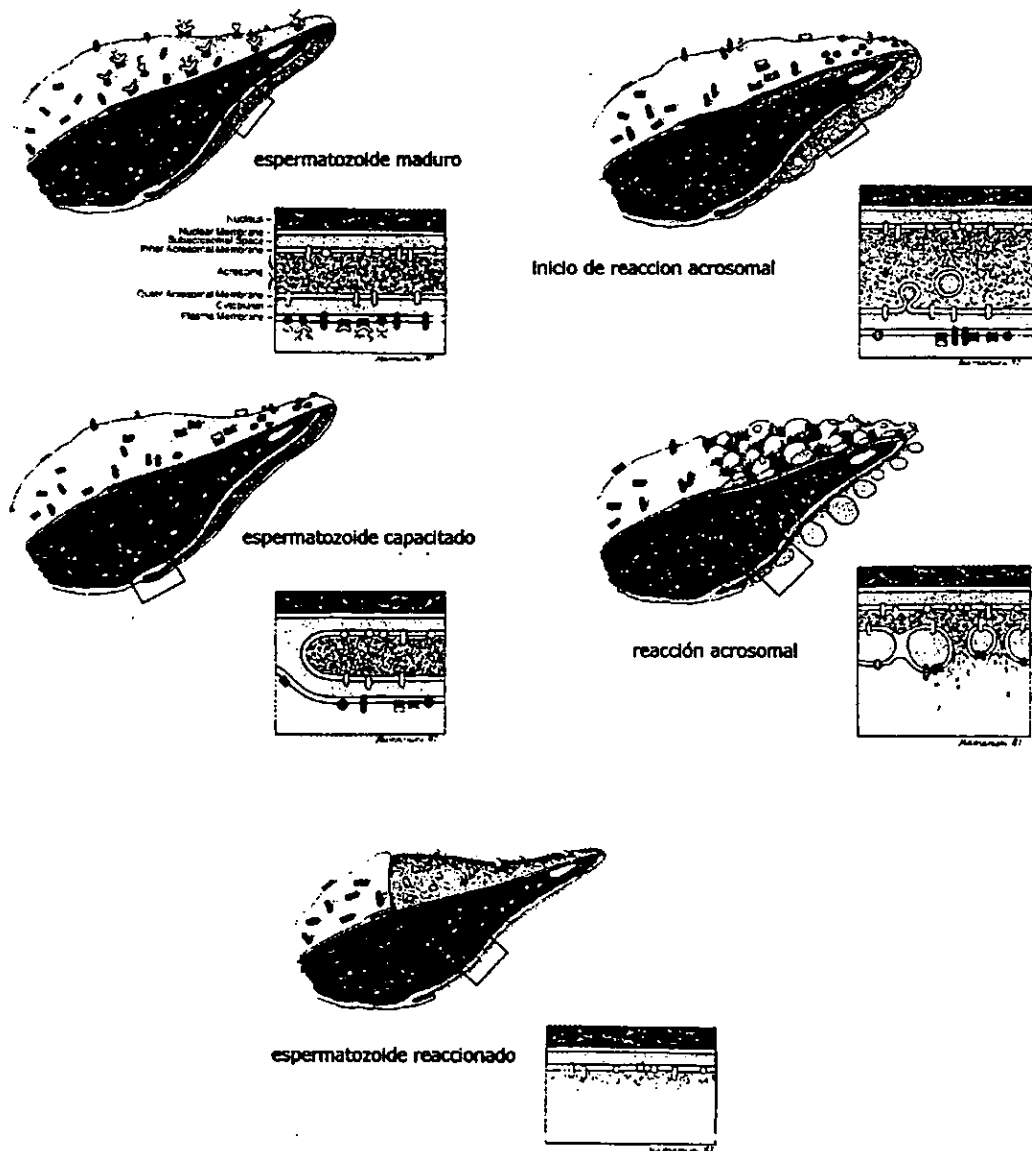


Fig. 2 Cambios estructurales que se producen en la cabeza del espermatozoid de mamífero durante los procesos de maduración, capacitación y RA. (tomado de C.H. Muller: *Germ cell Deveopment and Fertilization in Textbook of Physiology* vol II 21st Edition. Ed. H.D. Patton, A.F. Fuchs, B. Hille A.M. Scher, R. Steiner, 1989.

permeabilidad al K^+ , la cual podría ser responsable al menos de una parte de dicha hiperpolarización (Zeng y col., 1995).

Cambios en la concentración de segundos mensajeros intracelulares y estado de fosforilación de proteínas de membrana.

Se ha reportado que los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[HCO_3^-]_i$ producen fosforilación de proteínas durante la capacitación de espermatozoides de ratón (Visconti y col., 1996), bovino (Gelantino y col., 1997) y humano (Baldi y col., 1996). La fosforilación de proteínas en tirosina y el aumento de la motilidad de los espermatozoides requieren la presencia de HCO_3^- en el medio de capacitación. Se ha propuesto que estos efectos se deben a un aumento en la $[AMPC]_i$ mediado por activación de la adenilato ciclasa. Esto activaría en cascada primero a una PKA y luego a una tirosin cinasa, la cual finalmente fosforilaría un cierto grupo de proteínas importantes en el proceso de capacitación (Boatman y Robbins, 1991; Shi y Roldán, 1995; Visconti y col., 1995a,b).

C) La reacción acrosomal.

La reacción acrosomal (RA) es un requisito indispensable para que se produzca la fecundación. Este evento implica la comunicación a corta distancia entre ambos gametos y ocurre en especies tan filogenéticamente distanciadas como los equinodermos y los mamíferos. La RA es un proceso excitósico que en los mamíferos consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, exponiéndose así el sitio de unión al óvulo y produciéndose la liberación de enzimas líticas acrosomales que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo (fig. 3). La RA es un proceso exquisitamente regulado por ligandos específicos del óvulo y/o del tracto genital femenino (en las especies que poseen fecundación interna), cuyos efectos parecen estar mediados por receptores de superficie y proteínas G (por lo menos en mamíferos). Durante la RA se presentan cambios que incluyen alteraciones en la

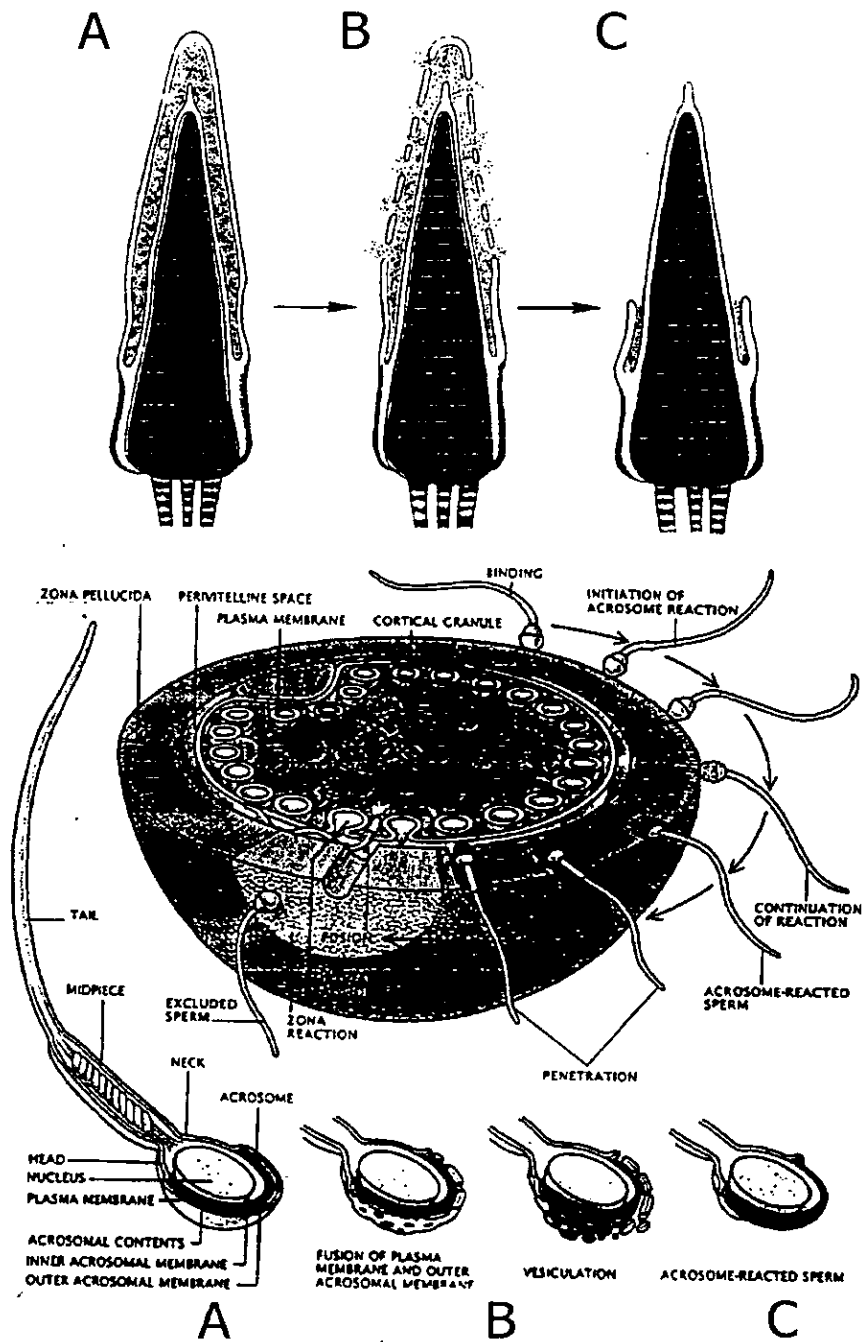


Fig. 3 Cambios ultraestructurales que se producen durante la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero. A: En un comienzo tanto la membrana, plasmática, como la membrana acrosomal externa y el contenido acrosomal están intactos. B: Posteriormente la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa, permitiendo la salida del contenido acrosomal. C: Finalmente, al término de la RA acrosomal, sólo la membrana acrosomal interna limita la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide, mientras que en el segmento ecuatorial persisten la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa cubriendo la vesícula acrosomal residual.

conductancia iónica, el metabolismo de los nucleótidos cíclicos y el metabolismo de los fosfoinosítidos del espermatozoide.

Me referiré a la RA en el erizo de mar y en mamífero por ser las especies en las que mejor se conoce la participación de canales iónicos.

Agentes inductores de la RA y cambios que se producen durante la misma.

A) Equinodermos: erizo de mar.

La gelatina que rodea al óvulo es el inductor fisiológico de la RA en el erizo de mar (Dan, 1952). El componente de la gelatina responsable de inducir esta reacción es un polímero de fucosa sulfatada (FSG), (Decker y col., 1976, SeGall y Lennarz, 1979; Garbers y col., 1983). La RA requiere además la presencia de Na^+ y Ca^{2+} así como un $\text{pH}=8$ en el agua de mar (Dan, 1954; Collins y Epel, 1977; Shackmann y Shapiro, 1981). La adición de FSG a los espermatozoides del erizo de mar produce numerosos cambios en la composición iónica y en la concentración de segundos mensajeros dentro del espermatozoide, muchos de los cuales preceden y están directamente involucrados con la RA. Estos cambios consisten en: entrada de Ca^{2+} y Na^+ a la célula y salida de K^+ e hidrogeniones (Shackmann y col., 1978; Garbers y Kopf, 1980; Shackmann y Shapiro, 1981; Garbers, 1989; Shackmann, 1989), dando como resultado un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Trimmer y col., 1986; Guerrero y Darszon, 1989 a,b), un aumento en el pH intracelular (pHi) (Lee y col., 1983; Guerrero y Darszon, 1989b), así como cambios en el potencial de membrana (Shackmann y col., 1984; González- Martínez y Darszon, 1987; García-Soto y col., 1991). El FSG produce también un aumento de la concentración intracelular de AMPc (Garbers y Kopf, 1980), y de la actividad de la protein cinasa A (Garbers y col., 1980, García-Soto y col., 1991). También se incrementa el recambio de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) (Domino y Garbers, 1988) y se estimula la actividad de la fosfolipasa D (Domino y Garbers, 1989). Aparentemente, el aumento de la concentración de AMPc resulta de la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (Watkins y cols., 1978), la cual es dependiente tanto de la presencia de Ca^{2+}

externo como del potencial de membrana (Beltrán y col., 1996). Aún no se conoce la relación entre los cambios que ocurren en la permeabilidad de la membrana y los cambios en las concentraciones de estos segundos mensajeros.

Usando colorantes potenciométricos, se han medido los cambios en el potencial de membrana inducidos por la adición de FSG en espermatozoides de erizo de la especie *L. Pictus*. Estos consisten en una hiperpolarización transitoria seguida de una depolarización. La hiperpolarización inicial es dependiente del K^+ externo y posiblemente sea mediada por la apertura de canales de K^+ (González-Martínez y Darszon, 1987). Dado que pequeños incrementos en la concentración externa de K^+ del agua de mar bloquean la entrada de Ca^{2+} , la RA (Shackmann y col., 1978), el aumento de pH_i (Guerrero y Darszon, 1989b) y la hiperpolarización (González-Martínez y Darszon, 1987), se ha propuesto que como resultado de esta hiperpolarización se activaría un intercambio Na^+/H^+ produciéndose un aumento de pH_i (González-Martínez, y col., 1992). No se conoce la identidad molecular de este intercambio Na^+/H^+ posiblemente vinculado a la RA. A la vez, dado que antagonistas de los canales de Ca^{2+} tales como el verapamil y las dihidropiridinas (DHP) (Shackmann y col., 1978; Garbers y Kopf, 1980; Kazazaglou y col., 1985; García-Soto y Darszon, 1985) y de los canales de K^+ como el tetraetilamonio (TEA), (Shackmann y col., 1978), inhiben la entrada de Ca^{2+} y la RA, se ha sugerido la participación de ambos tipos de canales iónicos en este proceso (Garbers, 1989; Darszon y col., 1994). Ionóforos como el A-23187 que intercambia Ca^{2+} por H^+ y la nigericina que intercambia Na^+ o K^+ por H^+ , alteran la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide e inducen la RA en ausencia del agonista fisiológico.

Mediante el uso de colorantes sensibles a Ca^{2+} , como el Fura-2, en el espermatozoide del erizo de mar se ha podido inferir la presencia de dos tipos de canales de Ca^{2+} que participan en la RA (Guerrero y Darszon, 1989a; Shackmann, 1989). El primero se activa transitoriamente cuando la gelatina del óvulo se une al receptor, se bloquea por bloqueantes orgánicos de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (CCVD) verapamil, dihidropiridinas (DHP) y trifluoperazina (TFP). El segundo canal se abre unos 5 segundos después, no se bloquea por estos compuestos pero sí por cobalto (Co^{2+}) y níquel (Ni^{2+}), no se inactiva y es menos selectivo que el primero, permitiendo el pasaje

también de manganeso (Mn^{2+}). Condiciones experimentales que impiden el aumento de pH_i inducido por la gelatina bloquean la apertura de este segundo canal y la RA, por lo que se postula que el pH_i modula a este canal. La apertura de este canal parece requerir la apertura del primero, siendo ambos necesarios para que la RA se desarrolle normalmente. Hasta el momento, no se sabe con exactitud cómo están conectados estos dos procesos entre sí. Tampoco están caracterizadas las vías por las cuales entra el Ca^{2+} y el mecanismo de regulación de la segunda vía de entrada de Ca^{2+} por el pH_i. La fig. 4 B ilustra los cambios de potencial, $[Ca^{2+}]_i$ y de pH_i en espermatozoides de erizo de mar inducidos por la gelatina.

Mediante la fusión de membranas de espermatozoide de erizo de mar de la especie *S. Purpuratus* a bicapas lipídicas planas, se han identificado dos tipos de canales de Ca^{2+} : uno de 50 pS dependiente de voltaje, y otro también dependiente de voltaje, de alta conductancia con un estado de conductancia principal de 172 pS en 10 mM Ca^{2+} y varios estados de subconductancia. Este último es insensible a verapamil y DHP y es bloqueado por Cd^{2+} y Co^{2+} a concentraciones similares a las requeridas para bloquear la RA y la entrada de Ca^{2+} inducida por la gelatina. Además este canal discrimina pobremente entre cationes monovalentes y divalentes ($P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+} = 5.9$) (Liévano y col., 1990). Es posible que esta vía de influjo de Ca^{2+} sea el segundo canal que participa en la RA, que permite la entrada de Mn^{2+} y es modulado por el pH_i. Las características de este canal de Ca^{2+} : alta conductancia, pobre selectividad, gran cantidad de subestados distan mucho de las propiedades de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (CCVD) (Snutch y Reiner, 1992) y se asemejan más a las de los receptores de Rianodina e IP_3 (Berridge, 1993), los cuales son sensibles al Ca^{2+} y al pH. Por lo tanto estos factores podrían regular el segundo canal que opera durante la RA, y constituir a su vez la relación con el primer canal que participa durante la misma.

Recientemente, se han logrado incorporar directamente a las bicapas lipídicas los espermatozoides de 2 especies de erizo de mar (*S. Purpuratus* y *L. Pictus*) y de ratón (Beltrán y col., 1994) y se ha encontrado que todos ellos poseen un canal de Ca^{2+} de alta conductancia, dependiente de potencial, con múltiples subestados y con $P_{Ba^{2+}}/P_{K^+} = 4$. La presencia de un canal de características similares en especies tan diversas sugiere que

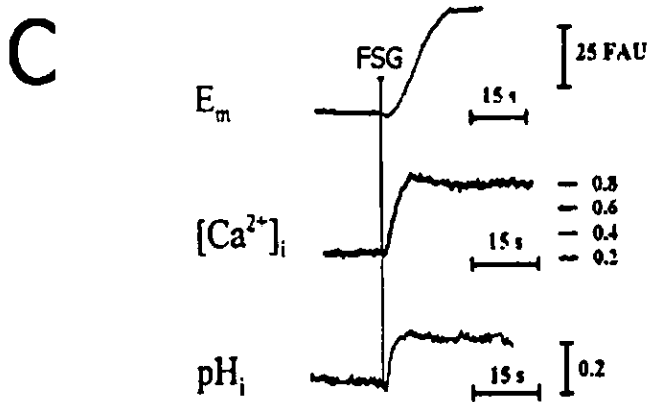
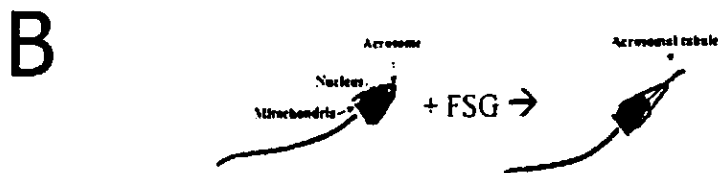
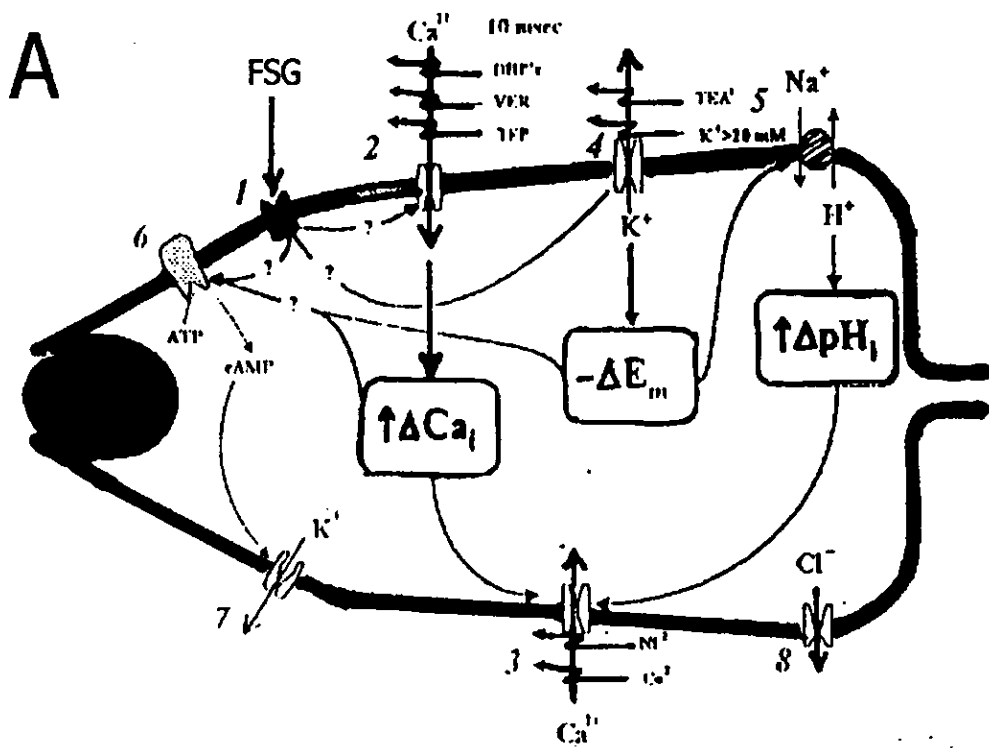


Fig. 4 A: Modelo de la RA del espermatozoide del erizo de mar. El factor del óvulo (FSG) se une al receptor del espermatozoide (1) abriendo un canal de Ca^{2+} (2) que se inactiva en pocos segundos. Este canal es sensible a DHPs, verapamil (VER) y trifluoperazina (TFP). La activación de este canal inicia un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de alguna manera modula la apertura de un segundo canal de Ca^{2+} (3) que es pH dependiente y que produce un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Al mismo tiempo, o inmediatamente después de la apertura del primer canal de Ca^{2+} , se activa un canal de K^+ (4) que hiperpolariza la célula y activa un intercambiador Na^+/H^+ voltaje dependiente (5) que produce un aumento del pH_i. Este aumento del pH_i está vinculado a la apertura del segundo canal de Ca^{2+} (3) produciendo una depolarización mayor. La hiperpolarización inducida por el factor, junto al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del pH_i estimulan una adenilato ciclasa (6) que a su vez modula otro canal de K^+ (7). Posiblemente los canales de Cl^- (8) están involucrados en el mantenimiento del potencial de membrana. (tomado de Darszon, A. y col.: *Ion Channels: Key elements in gamete signaling* (Currents Topics in Developmental Biology, 14: 117-167, 1996). **B:** Esquema de la RA en el erizo de mar. **C:** Cambios inducidos por el factor en potencial de membrana (E_m) (deflexiones hacia arriba representan depolarizaciones), en unidades de fluorescencia (FAU), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM) y pH_i (unidades de pH) medidos con colorantes sensibles a los mismos en poblaciones de espermatozoides de erizo de mar.

podiera tener un papel relevante en la fisiología del espermatozoide. La fig. 4 A ilustra en forma esquemática un modelo propuesto para explicar la RA en el erizo de mar (Darszon y col., 1996; Liévano y Darszon, 1995).

B) Mamíferos

En la regulación de la reacción acrosomal en el mamífero se han implicado cambios en la composición iónica y de segundos mensajeros similares a los descritos para el erizo de mar (Florman y Babcock, 1991; Ward y Kopf, 1993; Darszon y col., 1996). Usando agentes no fisiológicos como el ionóforo de Ca^{2+} A-23187 (Yanagimachi, 1988) o incubando las células en pH externo elevado, se ha demostrado que para que se produzca la RA se requiere aumentos de Ca^{2+} y de pH intracelulares. Los cambios producidos por el inductor de la RA en el mamífero se han comenzado a estudiar apenas recientemente. Muchos de estos estudios, referidos a gametos de ratón y de toro, se basan en experimentos efectuados en invertebrados marinos.

En el mamífero, el inductor fisiológico de la RA más aceptado es la Zona Pelúcida (ZP), (Saling, 1989; Wassermann, 1990 a,b; Bleil, 1991; Florman y Babcock, 1991; Ward y Kopf, 1993), la cual es una capa acelular que rodea al óvulo y que puede considerarse como una clase de matriz extracelular. La ZP se produce, ensambla y secreta por el ovocito durante su crecimiento, (Bleil y Wasserman, 1980c; Ward y Kopf, 1993). Dentro de la zona pelúcida se encuentran moléculas que median el reconocimiento y unión del espermatozoide al óvulo y que son responsables del bloqueo de la poliespermia. La ZP de ratón está constituida por tres glicoproteínas sulfatadas, denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassermann, 1980a,b; Shimizu y col., 1983; Wassermann, 1988). La ZP1 es un dímero de 200 kD que mantiene la estructura tridimensional de la ZP (Greve y Wassermann, 1985). La ZP2, de 120 kD, parece mediar la unión de los espermatozoides reaccionados a la ZP (Bleil y Wassermann, 1980a, 1986; Bleil y col., 1988; Mortillo y Wassermann, 1991). La ZP3 de 83 kD es la que posee la mayor capacidad para unir espermatozoides capacitados e inducir la RA (Bleil y Wassermann, 1980c, 1983). La porción carboxilo terminal de la ZP3 estaría asociada a su propiedad de unir a los

espermatozoides, y tanto la región proteica como la glucídica serían responsables de la inducción de la RA, (Rosiere, and Wassarman, 1992). Dado que sólo los acrosomas reaccionados se unen a la ZP (Saling, 1989) en forma especie-específica, es probable que existan receptores específicos para ZP3 en la membrana plasmática que cubre el acrosoma y este receptor podría mediar tanto la unión entre el espermatozoide y el óvulo como la RA. Se han propuesto diferentes tipos de receptores a la ZP3 en el espermatozoide. Los cuatro que cuentan con mayor aceptación son: una proteína de 56 kDA denominada sp56 (Bleil and Wassarman, 1989); una tirosin cinasa de 95 kDA (Leyton y col., 1992); β 1-4 galactosiltransferasa (Shur, 1993) y una proteasa relacionada con espermadesinas (McLeskey y col., 1998). Se ha propuesto que se requiere la agregación de los receptores para producir la RA (Bleil y Wassarman, 1983; Kopf y col., 1989; Leyton y Saling, 1989a, Boettger-Tong y col., 1992; Gong y col., 1995). Sin embargo la identidad del receptor para la ZP es aún controversial.

Una vez ocurrida la RA, los espermatozoides atraviesan el espacio perivitelino, y su membrana plasmática se fusiona con la del óvulo en regiones discretas situadas en la zona postacrosomal de la cabeza (Yanagimachi, 1988). Después de la fusión, el óvulo sufre la reacción cortical durante la cual se liberan proteasas que modifican la ZP. ZP2 se transforma en ZP2f (Bleil y col., 1981; Moller y Wassarman, 1989) la cual pierde su capacidad de interactuar con los espermatozoides reaccionados (Bleil y Wassarman, 1986); Bleil y col., 1988). Asimismo la ZP3 se transforma en ZP3f y esta modificación se acompaña de pérdida de su actividad biológica (Bleil y Wassarman, 1980a, 1983).

Mecanismo de acción de la ZP3.

Falta mucho todavía para entender el mecanismo por el cual la ZP3 induce la RA. Estudios realizados en espermatozoides murinos y de bovino usando indicadores de Ca^{2+} y de pH muestran que entre las respuestas más tempranas a la ZP y ZP3 se encuentran un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del pH_i (Lee y Storey, 1985, 1989; Endo y col., 1988; Florman y col., 1989; Kligman y col., 1991; Storey y col., 1992). Las proteínas Gi de alguna forma participan en estos cambios dado que ambos son inhibidos por preincubación en presencia

de toxina pertussis (Ptx), (Florman y col., 1989). Más recientemente Arnoult y col. (1996a) mostraron que es realmente el cambio de pH_i el que se modula por proteínas Gi.

La depolarización de los espermatozoides en un medio alcalino es una forma alternativa de inducir la RA. Tanto la depolarización como la RA se bloquean por Co²⁺, Ni²⁺ y DHP (Florman y col., 1992). Esto sugiere: 1) la existencia de canales de calcio dependientes del voltaje (CCVD) en los espermatozoides de ratón, carnero y toro, y 2) que la activación de estos canales en medio alcalino es necesaria para la entrada de Ca²⁺ que se produce durante la RA, tanto en presencia como en ausencia del agonista fisiológico. Se han encontrado a su vez sitios de unión de alta afinidad para la DHP PN200-110 (K_D = 0.4 μM) en membranas de espermatozoides de carnero y toro (Florman y col., 1992).

Condiciones depolarizantes que podrían abrir los canales de Ca²⁺ y sortear la inhibición producida por Ptx, inducen la RA (Florman y col., 1992). Estos experimentos indican que la apertura de los CCVD cuando el pH_i está elevado sería suficiente para inducir la RA, y que la activación de estos canales, en la cual está involucrada una proteína Gi, es un paso necesario en la transducción de la señal iniciada por ZP3. Por lo tanto los CCVD, de contribuir en forma preponderante en el aumento de la [Ca²⁺]_i producido por la ZP3, tendrían un papel fundamental en la RA. La inhibición de los canales de Ca²⁺ del espermatozoide podría explicar los efectos anticonceptivos que se han reportado en humanos sometidos a tratamiento crónico con DHPs (Benoff y col., 1994; Hershtlang y col., 1995).

El mecanismo por el cual la ZP3 activa estos CCVD no se conoce todavía. En un trabajo reciente, Florman y col., encuentran que la ZP3 induce la depolarización de espermatozoides de ratón y bovino, la cual se produce mediante un canal catiónico poco selectivo, que se bloquea por Cd⁺² y La⁺³ y es insensible a toxina pertussis (Arnoult y col., 1996a). Estos autores proponen que dicha depolarización abriría los CCVD presentes en estas células.

Previamente estos mismos autores habían descrito dos mecanismos de transporte de Ca²⁺ en espermatozoides de bovino. El primero produciría aumentos pequeños, transitorios y localizados del Ca²⁺ intracelular. La vía responsable de este influjo de Ca²⁺

no es dependiente del voltaje, conduce además otros cationes divalentes y se bloquea por Cd^{2+} . El segundo mecanismo produciría elevaciones globales de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y es farmacológicamente similar a un canal de Ca^{2+} de tipo L (Florman y col., 1994). Con base en sus hallazgos estos autores proponen el modelo que se describe a continuación.

La principal característica de este modelo es que la ZP3 produciría la activación de un canal catiónico no selectivo, el cual, en presencia de un potencial de membrana negativo determinaría una depolarización. Esta vía es insensible a Ptx. La ZP3 podría activar este canal mediante diferentes mecanismos p ej. activación directa o a través de segundos mensajeros generados independientemente de las proteínas G sensibles a Ptx. En este sentido se ha encontrado que el espermatozoide de mamífero posee actividad de tirosina cinasa estimulada por ZP3 (Leyton y Saling, 1989b, Leyton y col., 1992), así como proteínas G (Gq y Gz) insensibles a Ptx (Ward y Kopf, 1993). Por otro lado la ZP3 también activaría mecanismos que resultan en una alcalinización intracelular. Dicho aumento del pH_i podría regular CCVD presentes en estas células. En otras palabras, la ZP3 activaría una cascada de señalización bifurcada consistente en la apertura de un canal catiónico insensible a Ptx y la activación de un mecanismo regulador del pH_i sensible a Ptx. Según este modelo tanto la depolarización de la membrana como la alcalinización actuarían en forma concertada activando en forma más eficiente los CCVD (ver fig. 5).

Estudios en bicapas lipídicas (Cox y Paterson, 1989, Cox y col., 1991; Beltrán y col., 1994; Chan y col., 1997) y utilizando la técnica de fijación de voltaje en un parche de membrana (Espinosa y col., 1997) han demostrado la presencia en espermatozoides de mamífero de un canal catiónico pobremente selectivo, el cual podría ser el mismo que los autores del modelo describen como responsable de la depolarización.

Recientemente se clonó un canal de K^+ , denominado mSlo3 presente en células espermatogénicas de ratón el cual, de estar presente en el espermatozoide maduro podría causar su depolarización (Schreiber y col., 1998). Este canal tiene una $P_{\text{K}^+}/P_{\text{Na}^+} \approx 5$ y es dependiente del potencial de membrana y del pH_i activándose con la alcalinización intracelular.

Otros inductores de la RA en el mamífero

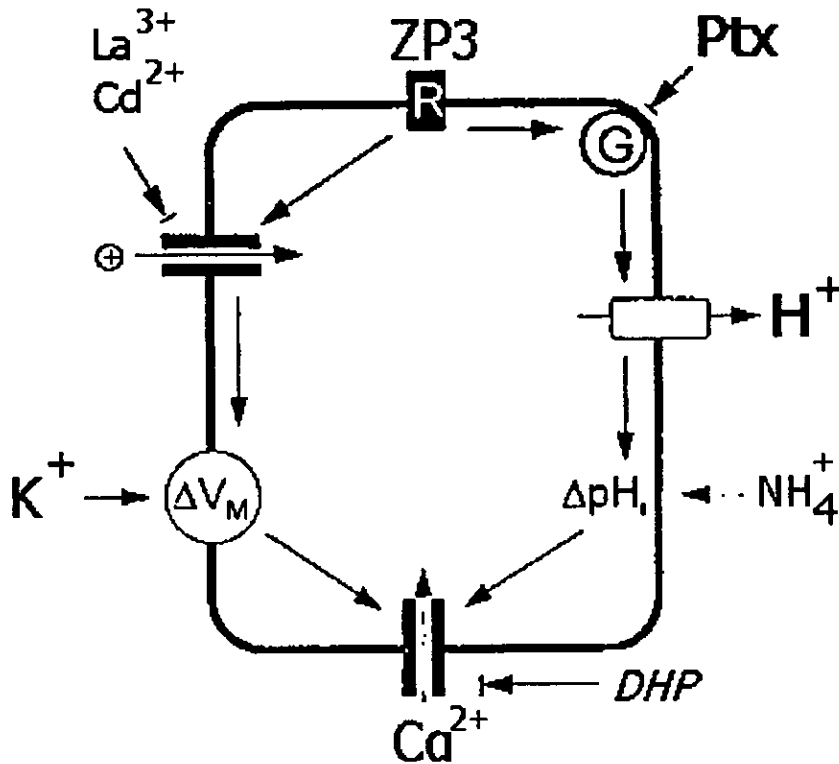


Fig. 5 Modelo de la transducción de la señal inducida por ZP3 en el espermatozoide del mamífero. La unión de ZP3 al receptor del espermatozoide (R) inicia una señal bifurcada. A) Por un lado se activa un canal catiónico a través de un mecanismo insensible a Ptx, determinando un influjo de cationes y una depolarización de la membrana (ΔV_m). Esta vía de activación puede reproducirse depolarizando con alto K^+ externo. B) por otro lado se activa una vía sensible a Ptx, produciendo alcalinización intracelular. Esta alcalinización puede inducirse experimentalmente con NH_4Cl . Los efectos de Ptx indican la participación de proteínas Gi en este proceso. Estas dos vías, actuando en forma concertada podrían regular la actividad de los canales de Ca^{2+} , permitiendo el influjo de Ca^{2+} y el inicio de la RA. La fig. también indica los sitios en los cuales la transducción de la señal se inhibe con Cd^{2+} , Ln^{3+} , Ptx y DHP (tomado de Arnoult y col., 1996a).

La RA se puede inducir por otros agonistas como la progesterona (Thomas y Meizel, 1989; Blackmore y col., 1990; Baldi y col., 1991; Meizel y col., 1997), ácido gaba amino butírico (GABA) (Wistrom y Meizel, 1993; Roldán y col., 1994; Shi y col., 1997), glicina, (Meléndrez y Meizel, 1995), factor de crecimiento epidérmico, (Lax y col., 1994), ATP (Foresta y col, 1996) y el factor activador de plaquetas (Sengokumal y col., 1996). Queda aún por investigarse el significado funcional de los efectos de estos agonistas.

La progesterona induce la RA y un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides humanos dependientes de la $[Ca^{2+}]_e$ (Thomas y Meizel, 1989; Blackmore y col., 1990; Baldi y col., 1991). La Ptx no inhibe el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por progesterona ni la RA, lo cual sugiere que la progesterona y la ZP3 activan vías de señalización diferentes que conducen a un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Por otra parte, Walensky and Snyder (1995) encontraron que la taspigargina induce la RA a altas concentraciones (5-10 μM) en espermatozoides de mamífero. Mediante el uso de anticuerpos, estos mismos autores localizaron receptores de IP_3 en la membrana acrosomal y reportaron liberación de $^{45}Ca^{2+}$ inducida por IP_3 desde acrosomas de espermatozoides permeabilizados. De acuerdo a sus resultados estos autores propusieron que el Ca^{2+} liberado por el acrosoma en respuesta a un aumento en la concentración de IP_3 participaría en la RA.

Por último cabe agregar que la RA acrosomal inducida por ZP, progesterona, y otros agentes no fisiológicos como el ionóforo A-23187, se acompaña de cambios en la $[AMPc]$, (Thomas y Meizel, 1989; Kopf y Gerton, 1990; Fraser y Monks, 1990; Florman y Babcock, 1991, Roldán y col., 1994; O' Toole y col., 1996). Estos cambios pueden afectar las actividades de PKC y PKA produciendo cambios en el estado de fosforilación de diversas proteínas durante la RA (Mendoza y col., 1995; Doherty y col., 1995), incluidos los CCVD (Arnoult y col., 1997).

Por lo expuesto hasta aquí, es claro que tanto en el espermatozoide del erizo de mar como en el del mamífero, el pH_i y la $[Ca^{2+}]_i$ parecen ser dos parámetros funcionalmente muy importantes, íntimamente relacionados y finamente regulados. El esclarecimiento de los mecanismos que vinculan y regulan estos 2 parámetros claves en la fisiología del espermatozoide podría ser de gran importancia para el

entendimiento de los mecanismos que regulan la RA y la fecundación. En este trabajo en particular nos interesó saber si en estas células existe alguna vía de entrada de Ca^{2+} activada por alcalinización intracelular. Para contestar esta pregunta se emplearon: microespectrofluorometría con colorantes sensibles a Ca^{2+} para medir cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y técnicas electrofisiológicas para registrar corrientes de Ca^{2+} .

Una limitante sin embargo, es que el espermatozoide del ratón tiene apenas 3 a 4 μM en su eje mayor. Ello hace muy difícil el registro de corrientes iónicas utilizando técnicas electrofisiológicas convencionales. Además, estas células no incorporan bien el Fura-2AM (colorante sensible a Ca^{2+}), lo que dificulta el registro de señales fluorescentes. En cambio sus células precursoras, las células espermatogénicas, son de mayor tamaño, y procesan muy bien el Fura-2 AM. El espermatozoide maduro es una célula de diferenciación terminal que carece de la maquinaria para la síntesis de proteínas (Hetch, 1988). Por lo tanto todos sus componentes proteicos fueron sintetizados durante la espermatogénesis. Siendo las células espermatogénicas más avanzadas las precursoras inmediatas del espermatozoide, es razonable suponer que un número importante de sus proteínas de membrana se conserven en el espermatozoide maduro. Las células espermatogénicas constituyen además un modelo de desarrollo por sí mismo interesante que puede servir para conocer por ejemplo, en qué etapa evolutiva aparecen los mecanismos que son relevantes para el funcionamiento del espermatozoide maduro.

Las células espermatogénicas pueden aislarse y mantenerse in vitro por varias horas en condiciones aceptables. De esta manera pudimos registrar corrientes de K^+ y de Ca^{2+} en células identificadas por criterios morfológicos (véase más adelante). Aunque se ha reportado que las corrientes de K^+ disminuyen y las de Ca^{2+} aumentan a lo largo de la espermatogénesis en rata (Hagiwara y Kawa, 1984), hasta la fecha no se tiene ninguna idea acerca de su rol funcional ni su regulación. En dos trabajos se reporta la existencia en estas células de ARNm correspondiente a un ADN que codifica para un nuevo receptor acoplado a proteínas G (Meyerhof y col., 1991; Parmentier y col., 1992), pero se desconoce aún cuál podría ser el ligando para dicho receptor.

El propósito central de este trabajo será entonces tratar de esclarecer la relación existente entre estos dos parámetros: Ca^{2+} y pH intracelulares utilizando el modelo de las células espermatogénicas. En particular nos interesa saber si el aumento del pH_i es capaz de inducir cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células individuales. Dado que nuestro modelo experimental está constituido por células de la línea espermatogénica del ratón, a continuación me referiré brevemente al proceso de diferenciación y maduración de estas células.

Epermatogénesis

El proceso de la espermatogénesis tiene lugar en el epitelio seminífero, ubicado dentro de los túbulos seminíferos, los que están compuestos por células espermatogénicas y células de Sertoli. Las células de Sertoli envuelven y dan soporte a las células espermatogénicas, (Jegou, 1993). Cada célula de Sertoli se extiende a lo largo de toda la altura del epitelio con su superficie basal contra la pared peritubular y su superficie apical hacia la luz del túbulo. Entre estas células se forman uniones estrechas que separan el epitelio seminífero en dos compartimientos: el basal y el adluminal. La frontera entre las mismas constituye la barrera hemato-testicular. El compartimiento basal contiene las espermatogonias y espermatocitos en etapas tempranas de diferenciación, mientras que el adluminal contiene los espermatocitos en etapas de diferenciación más tardías y las espermátides. Las células germinales del compartimiento basal se asientan entre la pared peritubular por fuera y las células de Sertoli por dentro. Las células espermatogénicas del compartimiento adluminal están completamente rodeadas por las células de Sertoli hasta que se forma el flagelo y se liberan en forma de espermatozoides en la luz del túbulo. Las células espermatogénicas permanecen unidas por puentes intercelulares a través de todo el proceso de la espermatogénesis hasta que se forma completamente el espermatozoide. El tiempo requerido para que una célula germinal dé origen a un espermatozoide es de 34.6 días en el ratón (Kretser y Kerr, 1988).

La espermatogénesis es un proceso continuo de proliferación y diferenciación celular que ocurre en tres etapas bien definidas (ver figs. 6 y 7):

1) Mitosis que consiste en la división mitótica de las gonias primitivas formando las espermatogonias de tipo A, intermedia y B de la cual se origina el espermatocito primario. En la rata y ratón se reconocen 4 generaciones de espermatogonias tipo A (A₁-A₄). La división de estas últimas produce la gonias Intermedias. Todos los tipos de espermatogonias se caracterizan por tener un citoplasma pálido con escasos organelos intracitoplasmáticos (Kretser y Kerr, 1988).

2) Meiosis Durante la meiosis, el espermatocito primario sufre la última duplicación del ADN (estado de preleptoteno), entrando así en la meiosis propiamente dicha y pasando por diferentes etapas: leptoteno, cigoteno y paquiteno (siendo ésta una de las etapas más fácilmente reconocible por el gran tamaño celular y el aspecto característico de la cromatina nuclear, la cual está muy condensada, ver métodos). Posteriormente ocurren dos divisiones meióticas sucesivas, la primera da lugar a los espermatocitos secundarios que contienen un número haploide de cromosomas pero diploide en lo que respecta a la cantidad de ADN. Estas células entran rápidamente en la segunda división meiótica que da origen a las espermátides redondas las cuales son células haploides tanto en el número de cromosomas como en la cantidad de ADN.

El citoplasma de los espermatocitos primarios es más electrodenso que el de las gonias y contiene mayor cantidad de organelos. Los espermatocitos secundarios tienen una vida media muy corta y es difícil encontrarlos en secciones de testículo marcados con timidina tritiada. Estas células son esféricas y de tamaño intermedio entre los espermatocitos primarios y las espermátides, con un diámetro de 10-12 μM . Se encuentran situadas cerca de la luz del túbulo y su núcleo posee cromatina dispersa con un nucléolo central (Kretser y Kerr, 1988).

3) Espermiogénesis Esta es una etapa de transformación en la cual el espermatocito secundario se convierte en el espermatozoide mediante una serie de cambios morfológicos que no involucran división celular. Durante este período el núcleo se condensa y se forman el acrosoma y el flagelo, liberándose también el citoplasma residual. Los tamaños y formas que van adquiriendo el núcleo y el acrosoma se utilizan para dividir la espermiogénesis en 16 estados en el ratón y 19 en la rata. Durante esta etapa sin embargo se pueden distinguir 2 fases características y muy abundantes: las

espermátides redondas y las condensantes. Las espermátides redondas son células esféricas de menor tamaño que los espermatocitos secundarios (8-10 μM de diámetro) y con núcleo pálido y esférico y nucléolo central muy prominente (ver métodos y fig. 8). En las espermátides condensantes el núcleo se condensa, la célula se polariza (el citoplasma empieza a migrar hacia la porción caudal de la célula) y se forma el flagelo. El acrosoma se forma a partir del complejo de Golgi donde varios gránulos proacrosomales se fusionan formando el gránulo acrosomal el cual entra en estrecho contacto con la membrana nuclear, luego esta se agranda y se aplanada adquiriendo la forma de una gorra que se extiende sobre la superficie nuclear. Con los cambios que se producen en la posición del núcleo, el acrosoma se va acercando a la membrana plasmática y finalmente queda ubicado de tal forma que su membrana externa queda adosada a la membrana plasmática y su membrana interna adosada a la membrana nuclear, (Clermont y col., 1993).

Es importante señalar que la síntesis de RNA mensajero se detiene durante las etapas tempranas de la espermiogénesis. Sin embargo, algunos RNA de vida media larga se almacenan en el citoplasma de las espermátides por cierto tiempo antes de ser activados y traducidos (Clermont y col., 1993).

La espermiogénesis demora 2 semanas en el ratón y 3 semanas en la rata, con las espermátides redondas ocupando la primera mitad del ciclo y espermátides condensantes en la segunda mitad. Una vez formados, los espermatozoides se liberan en la luz del túbulo mediante el proceso de espermiación.

Seleccionando apropiadamente la edad posnatal del ratón se pueden obtener preparaciones de células espermátogénicas en las que predominan una o más de las etapas mencionadas (ver fig. 7). Por ej. las espermátogonias son más abundantes en ratones de 8 días de edad, en tanto que en un ratón adulto las células más abundantes son las que se encuentran en las etapas de paquiteno, espermátide redonda y espermátide condensante (Bellvé y col., 1977). Estos últimos tipos celulares se identifican fácilmente mediante microscopía de contraste de fases (ver métodos).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente se describirán a continuación los objetivos de este proyecto.

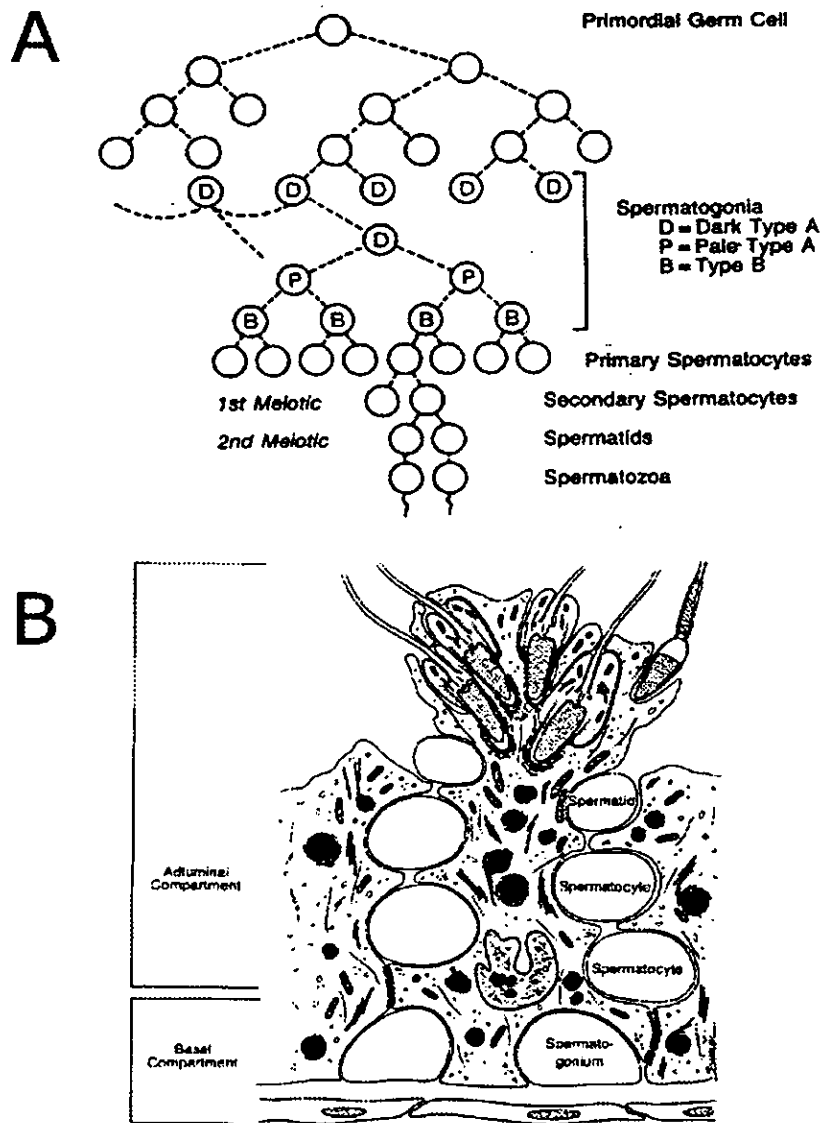


Fig. 6 Esquema de diferentes las etapas de la espermatogénesis y de la disposición de los diferentes tipos celulares en el túbulo seminífero. **A:** A partir de las células primordiales germinales se forman, por medio de divisiones mitóticas sucesivas, los espermatocitos primarios. Estos, en la primera división meiótica dan origen a los espermatocitos secundarios, los cuales en la segunda división meiótica originan las espermátides (células haploides). Estas a su vez por medio del proceso de espermiogénesis dan origen a los espermatozoides. **B:** En el túbulo seminífero las células más inmaduras se localizan en la parte basal del túbulo (compartimiento basal) y medida que va progresando la maduración se acercan a la luz en la cual se liberan los espermatozoides (tomado de Muller, C.H. Germ cell development and fertilization. In: Textbook of physiology vol 2 21st ed.. Edts N.D Patton, A.F. Fuchs, B. Hille, A.M. Scher and R. Steiner, 1989).

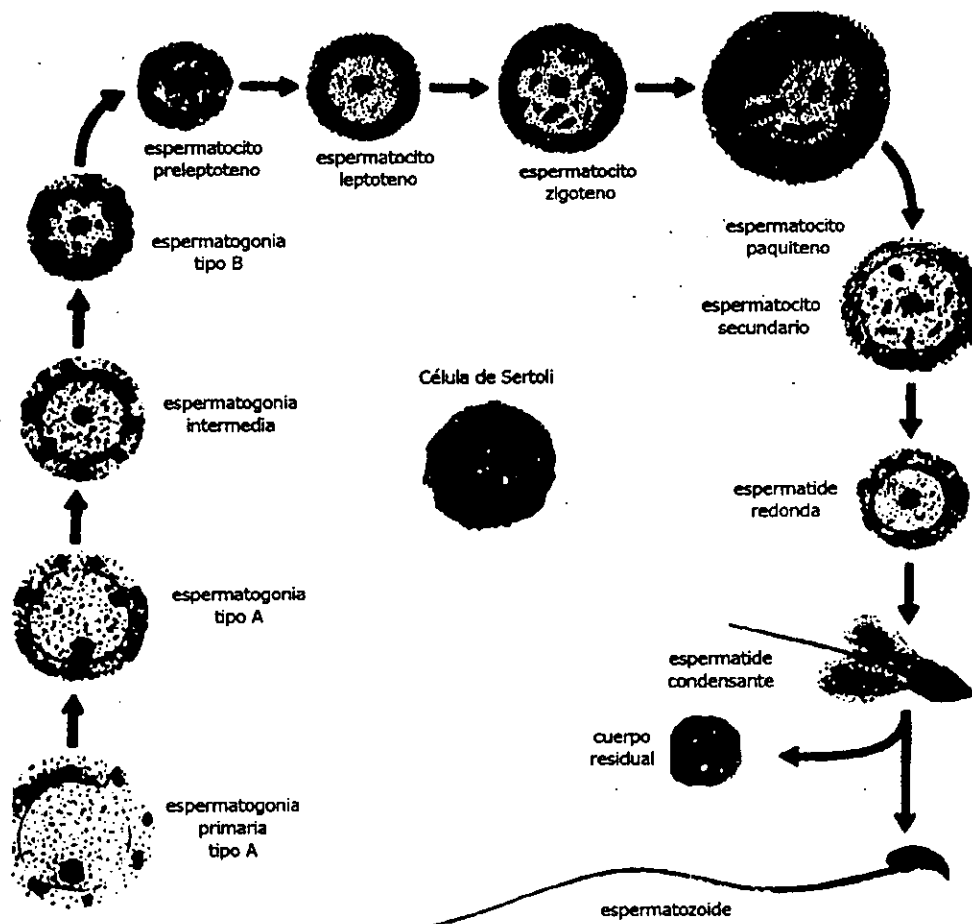


TABLE II
Temporal Appearance of Spermatogenic Cells during Development of the Mouse Testis*

Cell Type	Days after Birth								
	6	8	10	12	14	16	18	20	84
Primitive type A spermatogonia	18								
Type A spermatogonia		17	7	7	6	9	3	4	1
Type B spermatogonia		10	11	8	6	8	7	6	3
Preleptotene spermatocytes			15	11	9	5	10	7	2
Leptotene spermatocytes			15	12	13	5	5	9	2
Zygotene spermatocytes				23	14	7	8	8	2
Pachytene spermatocytes					15	27	36	33	15
Secondary spermatocytes							1	1	1
Round spermatids							1	4	31
Condensing spermatids									40
Sertoli cells	84	73	52	39	37	39	29	28	3

Fig. 7 Tipos celulares que aparecen en las distintas etapas de la espermatogénesis del ratón. En la figura se muestran los diferentes tipos celulares que aparecen durante las diferentes etapas de maduración. La tabla indica la secuencia temporal de aparición y el porcentaje de cada uno de los diferentes tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos durante la espermatogénesis (tomado de Bellvé y col., 1977).

II OBJETIVOS

Objetivo General.

El propósito central de este trabajo es tratar de esclarecer la relación existente entre el Ca^{2+} y el pH intracelulares en las células de la línea espermatogénica del ratón. En particular, estamos interesados en investigar la naturaleza de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vinculados con la alcalinización del medio intracelular en células en las etapas más avanzadas de la espermatogénesis, así como la relación que existe entre ambos parámetros tan relevantes en la fisiología del espermatozoide y para el proceso de fecundación. Para este propósito se emplearon técnicas que permiten alcalinizar en forma controlada el medio intracelular (véase métodos), al tiempo que se registraron los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células individuales identificadas.

Objetivos Particulares.

1) Caracterización de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la alcalinización intracelular.

Inicialmente, nos propusimos caracterizar las variaciones del Ca^{2+} intracelular que pudiesen inducirse por alcalinización intracelular en células que se encuentran en las etapas finales de la espermatogénesis, es decir espermátocitos en paquiteno, espermátides redondas y espermátides condensadas. Para ello comparamos tanto las concentraciones de Ca^{2+} en reposo, como el curso temporal y la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} que resultan de la alcalinización controlada en los diferentes tipos celulares. Después de esta caracterización inicial, profundizamos en aspectos tales como:

a) Estudio del origen de las señales de Ca^{2+} .

Los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ que encontramos, podrían deberse a un influjo transmembranal de Ca^{2+} , a la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares o a ambos mecanismos. Para cumplir con este objetivo decidimos estudiar cómo se afectan los transitorios de Ca^{2+} al eliminar el Ca^{2+} externo de la solución de perfusión. Con el fin de establecer si los reservorios intracelulares contribuyen o no al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ se utilizaron además manipulaciones que afectan la movilización de Ca^{2+} proveniente de estos reservorios.

b) Estudio de las características cinéticas de los transitorios de Ca^{2+}

Se midieron parámetros cinéticos del transitorio de Ca^{2+} tales como tiempo medio de subida y la constante de decaimiento. Estos parámetros nos permitieron tener una idea de qué tan rápido se produce el incremento de Ca^{2+} intracelular en relación al cambio de pH. Se realizó además una comparación cuantitativa de los valores de estas constantes en células en diferentes etapas del desarrollo.

c) Estudio farmacológico del transitorio de Ca^{2+}

Para continuar la caracterización de las posibles fuentes de la señal de Ca^{2+} , se emplearon agentes orgánicos e inorgánicos capaces de bloquear los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (CCVD). Esto nos permitió determinar el papel de los CCVD en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Asimismo, para determinar la posible participación de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares en este proceso se emplearon fármacos que poseen acciones específicas sobre los mismos, estudiando sus efectos sobre las características de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la alcalinización. Con el fin de conocer la selectividad de la vía de influjo de Ca^{2+} se utilizaron soluciones externas compuestas por otros cationes divalentes tales como bario (Ba^{2+}), estroncio (Sr^{2+}) y manganeso (Mn^{2+}).

2) Correlato electrofisiológico del posible influjo transmembranal de Ca^{2+} disparado por alcalinización del medio intracelular.

Dado que la participación de uno o varios CCVD se ha implicado en la RA, nos propusimos estudiar las características de las corrientes de Ca^{2+} presentes en células identificadas de la línea espermatogénica del ratón. En particular caracterizamos dichas corrientes, atendiendo sus semejanzas y diferencias con respecto a los transitorios de Ca^{2+} obtenidos en cuanto a su selectividad, farmacología y posible modulación por los cambios de pH intracelular. Para ello, se utilizó la técnica de fijación de voltaje en célula completa en células aisladas e identificadas provenientes del testículo de ratones adultos (véase métodos).

III MATERIAL Y METODOS

a) Obtención de las células espermatoogénicas.

Las células espermatoogénicas se obtuvieron mediante digestión enzimática del testículo de ratón adulto siguiendo el protocolo de Bellvé y colaboradores, (Bellvé y col., 1977) Brevemente, los ratones adultos son anestesiados y luego se sacrifican mediante dislocación cervical. Se remueven ambos testículos, y en un segundo paso se remueve la túnica que los envuelve denominada albugínea. Posteriormente se cortan en pequeños trozos y se incuban en solución salina sin Ca^{2+} conteniendo colagenasa 1mg/ml y DNasa 0.4 mg/ml durante 15 minutos. En este primer paso se logran separar los túbulos seminíferos del tejido intersticial. El segundo paso de la disociación enzimática consiste en incubar las células durante 10 minutos con solución salina conteniendo 0.4 mg/ml de tripsina. Ambos pasos se realizan a una temperatura de 29°C. Durante la disociación con tripsina se liberan las células espermatoogénicas aisladas de los túbulos seminíferos. Luego el tejido se lava con solución salina sin Ca^{2+} a la cual se le agrega 1% de BSA para interrumpir la acción de la tripsina y los pedacitos de túbulos seminíferos se trituran mecánicamente. La suspensión celular obtenida mediante este procedimiento se almacena a 4°C hasta su uso posterior. Una alícuota de dicha suspensión se coloca sobre un cubreobjetos tratado previamente con polilisina o Cell-Tack para facilitar la adhesión de las células y éste luego se monta en la camarita de registro (Warner Instruments, Mod. RC-25, Hamden, CT), que a su vez se coloca sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation, Japan). Las células utilizadas en los estudios iniciales se disociaron a un pH = 7.35. No obstante, descubrimos que las respuestas a la alcalinización intracelular eran más grandes en células previamente expuestas a medios ligeramente más alcalinos por lo que las disociaciones de las células utilizadas durante los experimentos que se mostrarán a continuación se hicieron a pH = 7.7. Durante los experimentos las células se perfundieron continuamente con solución salina compuesta por (en mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES y 5 glucosa, con un pH ajustado a 7.35 y a temperatura ambiente (20-24°C).

b) Identificación de los diferentes tipos celulares.

Mediante la disociación enzimática del testículo de ratón adulto se obtienen células pertenecientes a las etapas más avanzadas del ciclo de la espermatogénesis: espermátocitos primarios en etapa de paquiteno, espermátides redondas, espermátides condensantes y espermatozoides inmaduros. Estos diferentes tipos celulares son fácilmente identificables por su tamaño y las características del núcleo y nucléolo mediante microscopía de contraste de fases (Bellvé y col., 1977). Los espermátocitos primarios en paquiteno son las células más grandes de la espermatogénesis en el adulto, con un diámetro aproximado de 18 μM , una alta relación núcleo/citoplasma y la cromatina nuclear muy condensada. Las espermátides redondas tienen un diámetro aproximado de 10-12 μM , un núcleo pálido y un nucléolo central prominente. Las espermátides condensantes se caracterizan por la aparición del acrosoma, condensación nuclear, migración del citoplasma hacia la porción caudal de la célula y aparición del flagelo. La fig. 8 ilustra los diferentes tipos celulares obtenidos mediante el procedimiento de disociación enzimática descrito, vistos mediante microscopía de contraste de fases.

Se pueden reconocer las características nucleares con mayor facilidad mediante epifluorescencia, utilizando un colorante vital, Hoetch 33342 que tiñe la cromatina nuclear (fig. 9). Las células se incubaron durante 10 min. con el colorante a una concentración de 1 mg/ml. Luego de lavar el colorante las células se iluminaron utilizando una longitud de onda (λ) de excitación de 380 nm y se colectó la luz emitida a 510 nm.

Durante el proceso de disociación los puentes celulares que mantienen unidas a estas células entre sí dentro del túbulo seminífero se rompen, sin embargo ocasionalmente en lugar de romperse, éstos se dilatan permitiendo la confluencia de dos o más células de una misma etapa de diferenciación. Las estructuras multinucleadas así originadas se denominan sinplastos.

Algunos de los experimentos que se mostrarán se realizaron en espermatogonias obtenidas mediante disociación enzimática del testículo de ratón de 1 semana de edad con el método descrito anteriormente.

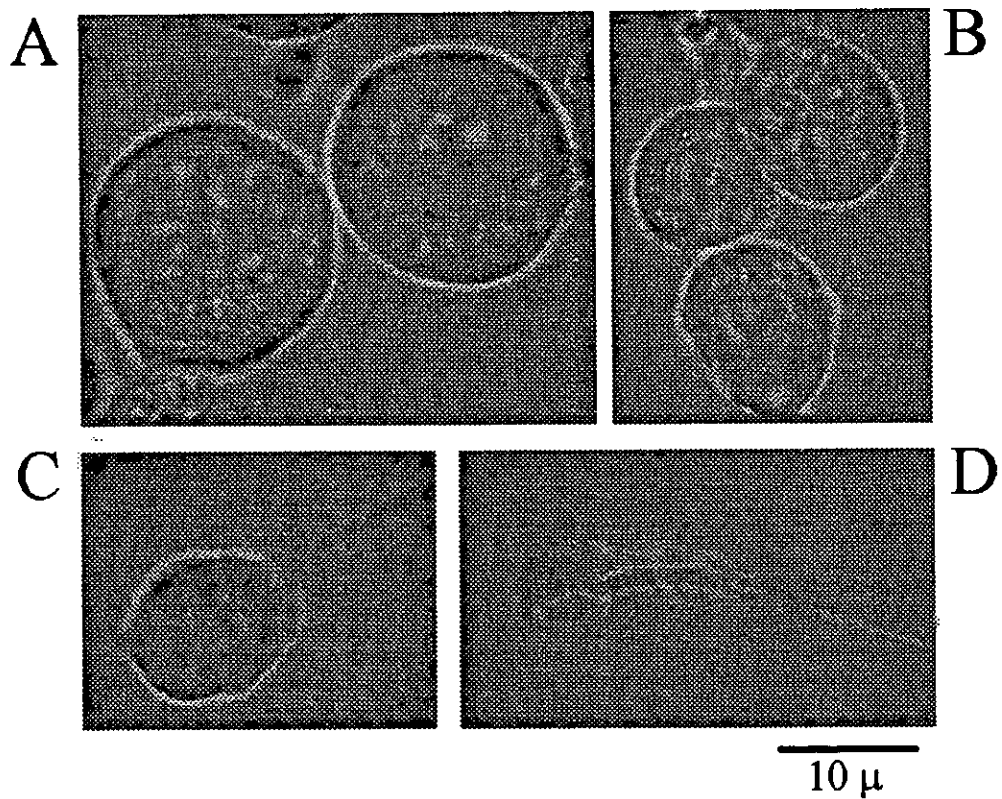


Fig. 8 Fotografías en contraste de fase de células espermatogénicas aisladas de testículo de ratón adulto. A: espermatocitos en paquíteno, B: espermatídes redondas y condensadas C: espermatíde condensada, D: espermatozoide testicular.

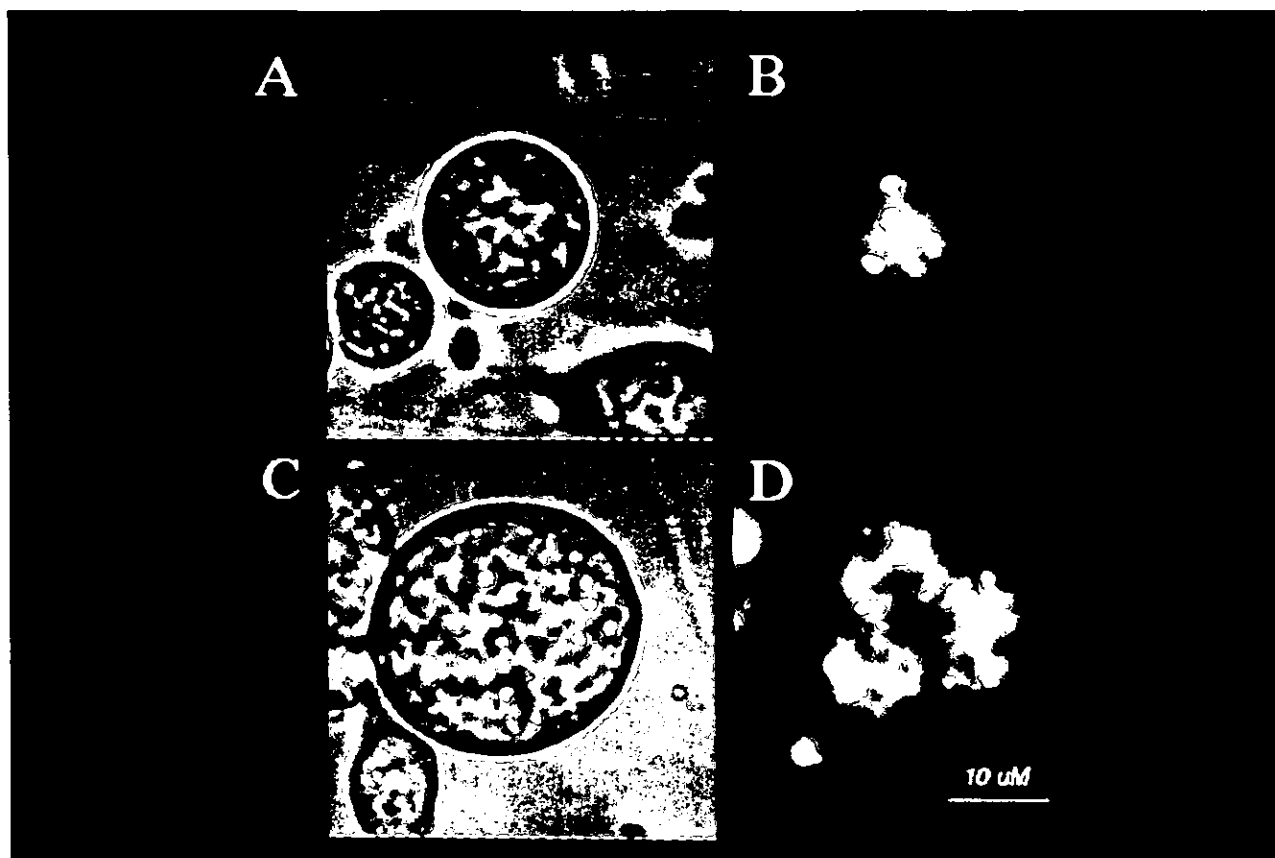


Fig. 9 Fotografías de células espermatogénicas aisladas del testículo de ratón adulto obtenidas en contraste de fase y epifluorescencia A y B: espermatocitos en paquiteno aislados, C y D: sinplasto resultante de la fusión de 3 espermatocitos en paquiteno. Barra de calibración, 10 μm .

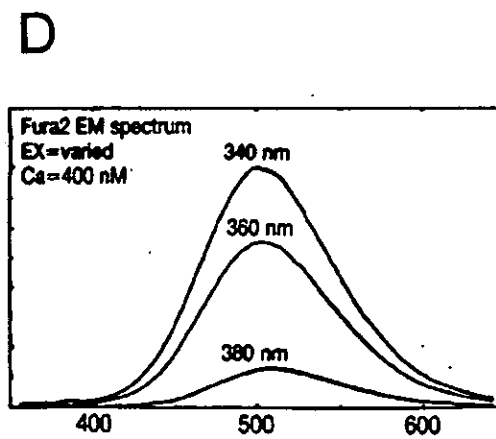
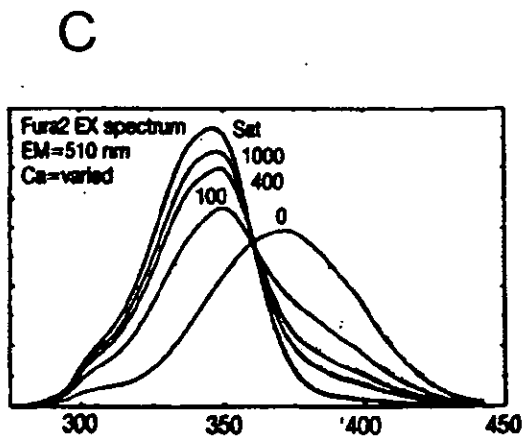
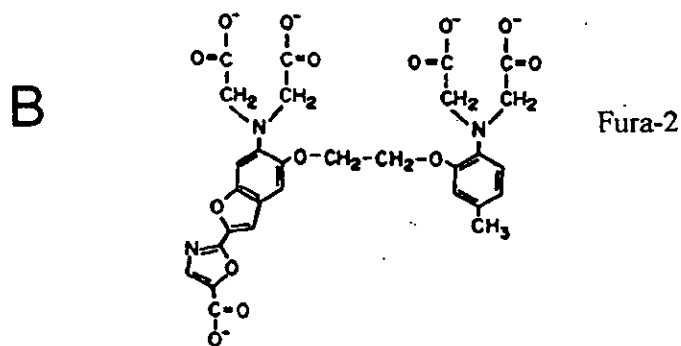
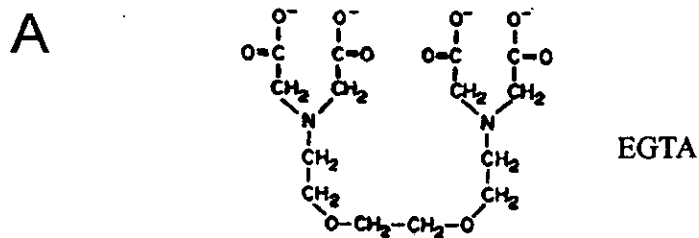
c) Medición de la concentración de Ca^{2+} intracelular

Para las mediciones de Ca^{2+} intracelular se utilizó el Fura-2 por ser éste un colorante que tiene la capacidad de unir Ca^{2+} y cambiar sus propiedades ópticas como consecuencia de esta unión. El Fura-2 es una molécula derivada del EGTA (quelante de Ca^{2+}) a la cual se le agrega un fluoróforo que tiene la capacidad de cambiar sus propiedades espectroscópicas al unir Ca^{2+} (fig. 10 A, B). Esta molécula tiene una afinidad por Ca^{2+} 5 a 6 órdenes de magnitud mayor que por Mg^{2+} lo cual la hace indicada para medir los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dentro de los colorantes sensibles a los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el Fura-2 tiene la ventaja de ser un colorante que tiene diferente sensibilidad por el sustrato a dos o más longitudes de onda (λ) de excitación o de emisión (en el caso del Fura es para dos λ de excitación). El espectro de excitación del Fura tiene un máximo a 340 nm cuando el Ca^{2+} está unido al Fura y este máximo se desplaza a 380 nm en ausencia de Ca^{2+} (fig. 10 C). Para la $\lambda = 360$ nm la intensidad de fluorescencia del Fura libre es igual a la del Fura unido a Ca^{2+} o sea es el punto isobéptico del espectro de excitación del Fura. El espectro de emisión presenta un solo pico a 510 nm (Fig. 10 D). Este método de medición permite que las mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sean independientes de la concentración del colorante utilizado, del grosor del espécimen o de la trayectoria óptica.

La intensidad de de una señal fluorescente (F) se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$F = I \epsilon \Phi d C \alpha$$

Donde I es la intensidad de la luz de excitación, ϵ es el coeficiente de extinción que especifica el grado de absorción de la luz incidente respecto a una concentración dada del indicador, ($\epsilon(\lambda) = \text{absorbancia}/\text{concentración}$). Dado que la concentración del indicador en un espécimen es limitada, entonces es importante tener un alto valor de ϵ ; Φ es la eficiencia cuántica, que está dada por el cociente entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos. Los mejores indicadores fluorescentes tienen una eficiencia cuántica cercana a 1. C es la concentración del indicador en la preparación y d es el grosor



$$[Ca] = K_d (R - R_{min} / R_{max} - R) \beta$$

$$K_d = 300 \text{ nM}$$

Fig. 10 Moléculas de EGTA y de Fura-2 (A y B respectivamente).

C y D: Espectros de excitación y de emisión del Fura-2 .

del espécimen a través del cual debe pasar la luz. α es un factor instrumental relacionado con la capacidad del microscopio para coleccionar y liberar la fluorescencia emitida hacia el detector y con la eficiencia del detector para traducir los fotones incidentes en una señal eléctrica.

Midiendo la fluorescencia emitida por el Fura atrapado dentro de las células a estas dos longitudes de onda seleccionadas, se puede calcular la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}] = K_D (F_f/F_b)(R-R_{min})/(R_{max}-R)$$

Donde:

R = razón de fluorescencias 340/380 nm

F_f/F_b = razón de fluorescencias Ca^{2+} libre/ Ca^{2+} unido a 380 nm

K_D = constante de disociación del Fura para el Ca^{2+}

R_{max} y R_{min} = razón máxima (a concentración saturante de Ca^{2+}) y mínima (en ausencia de Ca^{2+}) respectivamente de fluorescencias a 340/380 nm.

Esta ecuación indica que para deducir la $[Ca^{2+}]_i$ no se necesita conocer la concentración del colorante, ni las características geométricas de la célula. Sólo se requiere conocer la K_D y los valores extremos de razón de fluorescencia R_{min} y R_{max} .

El Fura 2 es un anion policarboxilado, polar y por lo tanto impermeable a través de la membrana plasmática. En su forma cargada este indicador debe introducirse a las células mediante microinyección o permeabilización. Otra alternativa introducida por Grynkiewicz y col., (1985) es el uso de la forma éster del colorante. Esta forma Fura-AM es hidrofóbica por lo que puede pasar fácilmente a través de membranas. Una vez dentro de célula, el Fura-AM es atacado por esterasas celulares que lo dejan en su forma ácida, quedando así atrapado en el interior y con los grupos carboxilo libres, esenciales para detectar el Ca^{2+} intracelular (Kao, 1994; Manual Axon Imaging).

Una vez disociadas, las células se incubaron con Fura-2AM (1 μ M) durante 0-60 minutos a temperatura ambiente. Las células cargadas con Fura se colocaron en una camarita con un sistema de perfusión continuo con solución Ringer normal de mamífero sobre la platina de un microscopio invertido. Allí se iluminaron alternativamente con luz monocromática proveniente de dos láseres pulsados de nitrógeno: uno sintonizado a $\lambda =$

340 nm y otro a $\lambda = 380$ nm. La luz de excitación se hace llegar al microscopio invertido a través de una fibra óptica bifurcada.

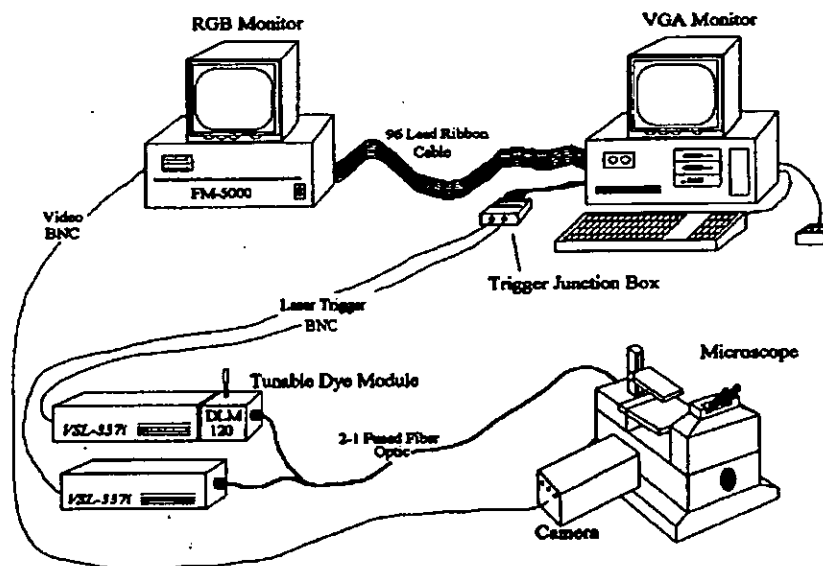
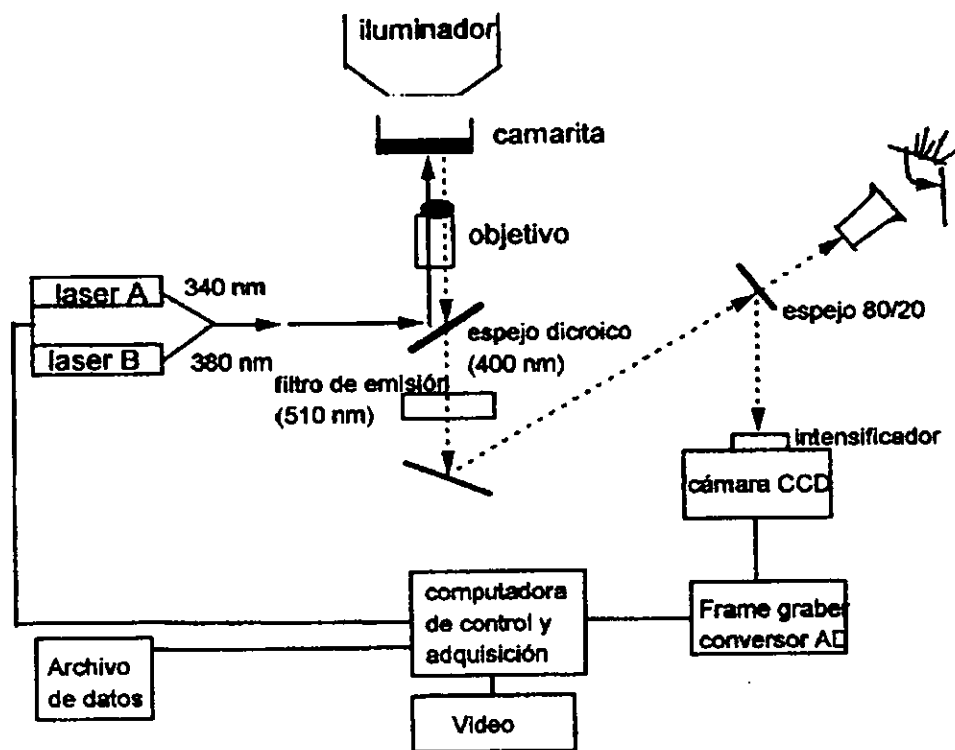
Un objetivo (100x) de inmersión en aceite de alta apertura numérica (NA=1.3) capta la fluorescencia emitida por las células y ésta pasa a través de un espejo dicroico, con un filtro de barrera de 510 nm, hasta una cámara CCD provista de un intensificador de imágenes. Las imágenes digitalizadas correspondientes a las λ de excitación de 340 y 380 nm se adquieren y almacenan en la memoria de la computadora (véase fig.11). Al término de cada corrida, los valores numéricos correspondientes a las fluorescencias de ambas λ ; provenientes de áreas de interés previamente delimitadas, se almacenan en discos magneto-ópticos para su posterior análisis. La frecuencia de disparo de los láseres, la adquisición de las imágenes y la cuantificación de la fluorescencia en las áreas de interés son controladas desde la computadora por el programa FL2.

El sistema empleado en estos experimentos (Bio-Lase imaging) permite la adquisición simultánea de la fluorescencia proveniente de múltiples áreas de interés emplazadas en diferentes células o dentro de regiones de una misma célula. El análisis de los resultados obtenidos se realizó utilizando rutinas en los programas SIGMAPLOT y ORIGIN

Calibración de la señal de Ca^{2+} . Los valores de F_f/F_b , R_{min} , y R_{max} se determinaron midiendo la fluorescencia de un capilar de vidrio de 100 μm de diámetro externo por el que se hacían pasar soluciones con 50 μM de Fura-2 (sal de pentapotasio; Molecular Probes), y concentraciones de Ca^{2+} conocidas en el rango de 10 nM a 40 μM . Aunque intentamos realizar calibraciones *in situ*, encontramos muy difícil manipular $[Ca^{2+}]_i$ en el rango requerido. Nuestras medidas de $[Ca^{2+}]_i$, basadas en calibraciones *in vitro*, podrían subestimar de la verdadera $[Ca^{2+}]_i$ debido a los efectos de viscosidad y de la unión del colorante a constituyentes citoplasmáticos (Konishi y col., 1988).

d) Medición del pHi

Para las mediciones de pH intracelular se utilizó el BCECF, un colorante sensible a los cambios de pH a dos λ diferentes (fig. 12 A). El BCECF tiene un espectro de



Typical System Components Layout

Diagram 2

Fig. 11 Dispositivo experimental para el registro y adquisición de señales fluorescentes. Los lasers se sintonizan a las longitudes de onda (λ) de excitación del colorante utilizado. La luz de los lasers (línea continua) incide sobre un espejo dicróico con un filtro de barrera que refleja las $\lambda < 510$ nm, de tal manera que la luz incide en la camarita donde se encuentra la preparación en estudio. La fluorescencia emitida por las células (línea punteada) es captada por un objetivo (100 X) de alta apertura numérica ($NA = 1.3$), pasa a través del filtro de barrera y es captada luego por una cámara CCD provista de un intensificador de imágenes. Las imágenes digitalizadas correspondientes a las longitudes de onda de excitación son adquiridas y almacenadas por la memoria de una computadora. Los valores numéricos correspondientes a las fluorescencias de ambas longitudes de onda provenientes de las áreas de interés, se almacenan en discos magneto-ópticos para su posterior análisis. La frecuencia de disparo de los lasers, la adquisición de las imágenes y la cuantificación de la fluorescencia en las áreas de interés, preseleccionadas, se controlan desde la computadora por medio del programa FL2.

excitación que a 440 nm es insensible a los cambios de pH (punto isobéptico), mientras que a una λ de excitación de 500 nm la fluorescencia aumenta con el aumento de pH. El cociente de fluorescencias entre estas dos longitudes de onda (500/440) es proporcional al aumento de pH. El espectro de emisión del BCECF tiene un máximo a 530 nm (fig. 12 B). Las células se incubaron con la forma éster del BCECF (BCECF-AM) a una concentración de 4 μ M durante 10 min y a temperatura ambiente.

En algunos de los experimentos, la medición de pHi se realizó excitando a una sola λ . En este caso se iluminaron las células cargadas con BCECF con un solo laser de nitrógeno pulsado sintonizado a 505 nm. La luz emitida por las células se colectó a través de un espejo dicróico provisto de un filtro de barrera de 510 nm/520 nm colocado en la trayectoria de la luz. Estos experimentos se realizaron con el propósito de seguir las variaciones de pHi con alta resolución temporal (< 1s). Las señales obtenidas con este método semicuantitativo se graficaron como variaciones en la fluorescencia del BCECF con respecto a la fluorescencia basal ($\Delta F/F_0$).

La doble excitación se utilizó para determinaciones cuantitativas del pHi. Para ello se usó un sistema de medición diferente. Para excitar a dos λ diferentes, en lugar de dos láseres, se empleó un espectrofluorómetro SLM 800 (SLM Aminco, Rochester, NY, USA) ajustando las λ requeridas con un cubo Nikon B-2A. La luz de excitación se hizo llegar al microscopio invertido a través de una fibra óptica. La fluorescencia emitida por un grupo selecto de células cargadas con BCECF se midió utilizando un objetivo UV y una cámara CCD provista de un intensificador de imágenes. (Hamamatsu c2400-87). Las longitudes de onda de excitación generadas por el espectrofluorómetro, la adquisición de las imágenes y la determinación en forma alternada de la fluorescencia en las áreas de interés, se controlaron con el programa Image-1/FL (Universal Imaging Corp. West Chester PA, USA) utilizando una computadora PC/AT de 66 MHz. Este sistema permite una medida continua de los cocientes de fluorescencia corregidos por la fluorescencia de fondo del BCECF a 500/440 nm en intervalos de aproximadamente 2 segundos.

Calibración de pHi: Al final de cada experimento la fluorescencia emitida por un grupo de células durante la aplicación de 10 μ M de nigericina (ionóforo de K^+/H^+) se monitoreó en un medio rico en K^+ (KCl 130 mM, NaCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1

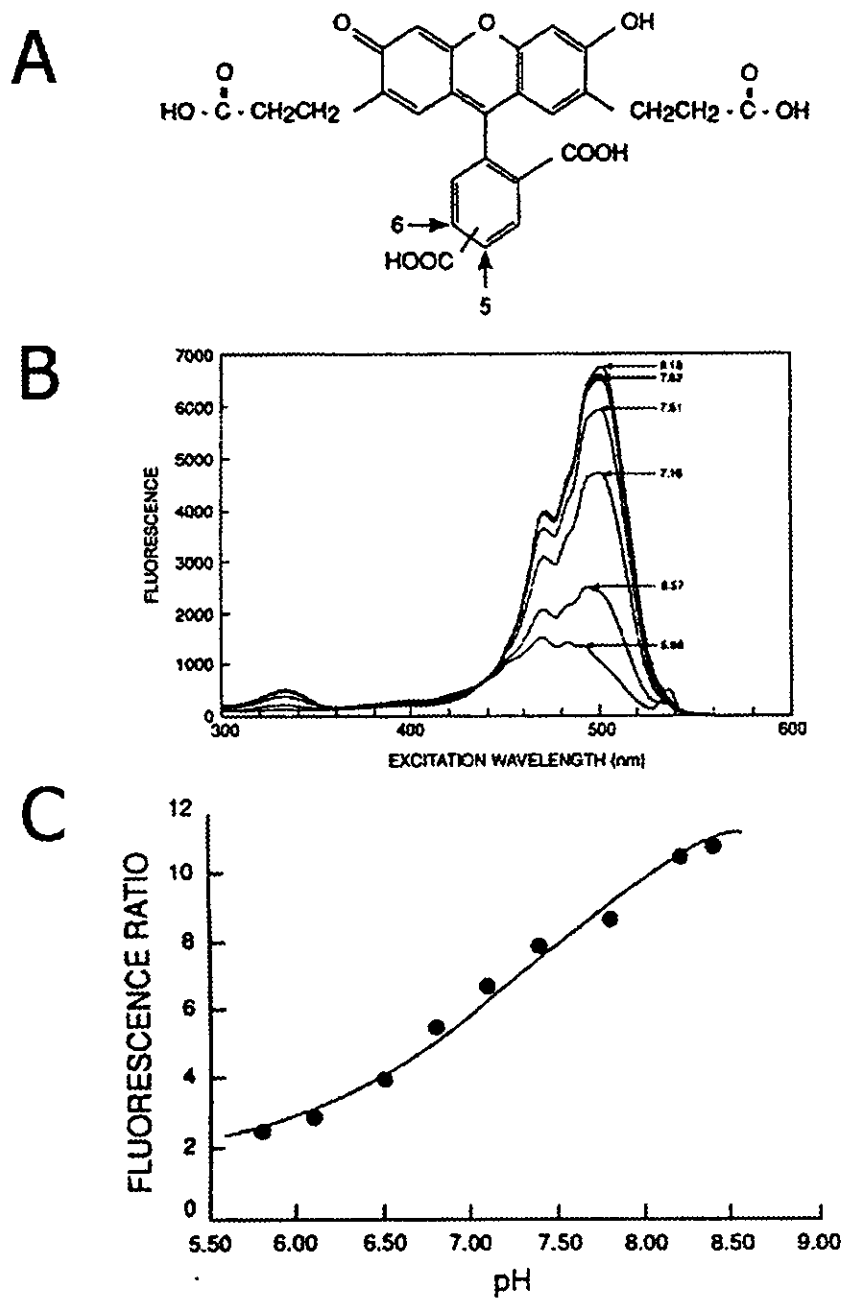


Fig. 12 A: Molécula de BCECF (indicador fluorescente sensible a pH)
B: Espectro de excitación del BCECF. **C:** Curva de calibración del BCECF.

mM, K-HEPES 10 mM). Este protocolo permite igualar el pH intracelular con el extracelular, lo cual se utiliza para realizar la calibración *in situ* de las señales de BCECF. Los cocientes de fluorescencia se obtuvieron de células expuestas a una solución externa que contiene nigericina con el pH ajustado a diferentes valores en un rango de 6.2 a 9. Estos cocientes se graficaron posteriormente y la gráfica resultante se ajustó utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pK}' + \log \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right)$. Los valores de R_{\max} , R_{\min} (cocientes de 500/440 máximo y mínimo respectivamente) y pK' se introdujeron en la misma ecuación para calcular los valores de pH_i obtenidos durante los experimentos (figs. 13 A-D), (Putnam, 1995).

Uno de los problemas que pueden surgir al utilizar las formas AM de los colorantes es la compartimentalización. La forma éster AM de estos colorantes puede penetrar no sólo al citoplasma sino también a otros compartimientos subcelulares, por lo que cierta fracción del colorante puede quedar atrapada en organelos intracitoplasmáticos. Por otro lado algunas células realizan una endocitosis activa de ciertos componentes que se encuentran en el medio de incubación incluyendo los ésteres AM, los cuales luego son hidrolizados, liberándose las moléculas del indicador fluorescente dentro de los organelos incluidos en el camino de la endocitosis. Dado que este proceso de endocitosis es dependiente de la temperatura de incubación, puede minimizarse incubando las células a temperaturas no muy altas de tal manera de asegurarnos un adecuado cargado de las mismas y la menor compartimentalización. En general esto se logra de manera bastante efectiva incubando las células a temperatura ambiente. Dado que la mayoría de los organelos subcelulares tienen altas concentraciones de Ca^{2+} , el indicador confinado a los mismos se saturaría y podría contribuir con una señal fluorescente de considerable magnitud que además no cambia con los cambios de concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Por lo tanto la compartimentalización tiende a dar una medida del Ca^{2+} intracitoplasmático mayor de lo que realmente es.

En nuestros experimentos, observamos que las fluorescencias tanto del Fura-2AM como del BCECF-AM se distribuyeron en forma homogénea dentro de las células y no en forma puntiforme lo cual sugiere que la compartimentalización de ambos colorante fue mínima.

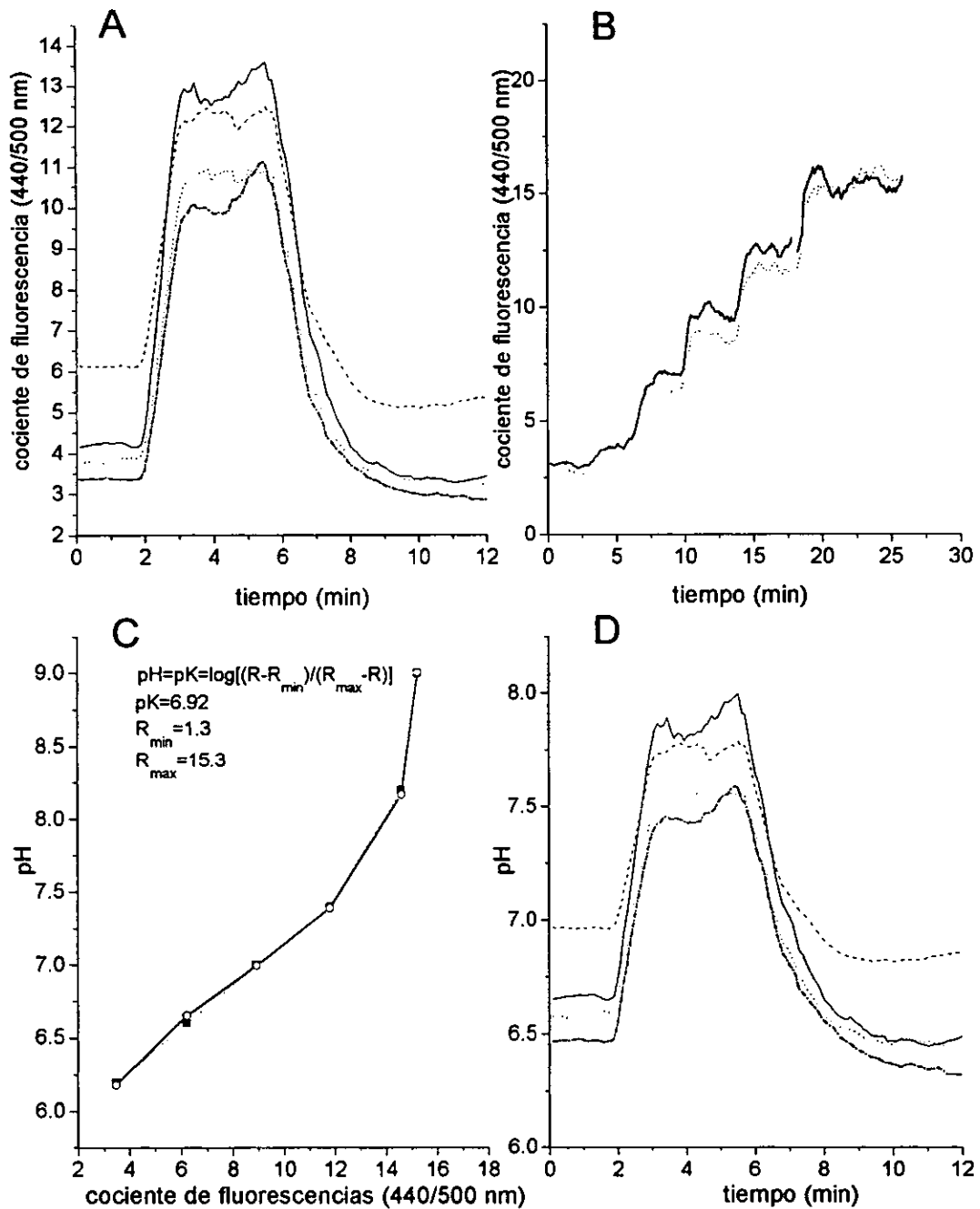
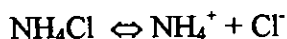


Fig. 13 Calibración del pH. **A:** registros de los cambios en el cociente de fluorescencias del BCECF (440/500 nm) durante un pulso de 25 mM NH_4Cl en 4 células espermatozógenas. **B:** cocientes de fluorescencia 440/500 nm a diferentes pH en presencia de 10 μM nigericina para 2 de las células espermatozógenas que se muestran en A. **C:** curva de pH vs cociente de fluorescencias 440/500 nm obtenida a partir de B. **D:** valores de pH obtenidos a partir de B y C para las mismas 4 células que en A.

e) Procedimiento de alcalinización intracelular.

Para alcalinizar el interior celular se utilizó una base débil, el NH_3 o la trimetilamina (TMA) las cuales permean en forma pasiva a través de la membrana celular. Los cambios de pH intracelular se hicieron de la siguiente forma: se colocó sobre la célula en estudio, a una distancia aproximada de $100 \mu\text{M}$ y con ayuda de un micromanipulador una micropipeta de vidrio en la cual 25 mM del NaCl del Ringer normal se sustituyeron por 25 mM de NH_4Cl . El contenido de la pipeta se libera directamente sobre la célula mediante la aplicación de pulsos de presión positiva (10 psi) de duración variable generados por un dispositivo Picospritzer (General Valve Corp.).

En solución, el NH_4Cl se disocia de acuerdo a la siguiente reacción:



El NH_3 difunde libremente a través de la membrana y una vez dentro de la célula capta protones, alcalinizando así el interior celular (fig. 14). Este método de alcalinización intracelular se ha utilizado en espermatozoides de erizo de mar (García-Soto y Darszon, 1985, García-Soto y col., 1987), así como en muchos otros tipos celulares (Ikeda y col., 1991, Batlle y col., 1993).

Otros fármacos o soluciones de prueba requeridos se aplicaron por medio de una segunda pipeta de microperfusión colocada en la vecindad de la o las células en estudio, utilizando otro micromanipulador independiente y controlada por un Picospritzer independiente.

f) Registros electrofisiológicos.

Estos fueron realizados utilizando la técnica de fijación de voltaje en célula completa (FVCC) (Hamill y col., 1981). Mediante el uso de esta técnica el potencial de membrana se mantiene constante, al mismo tiempo que se mide la corriente que pasa a través de la membrana. Manteniendo el potencial de membrana en un valor constante, nos

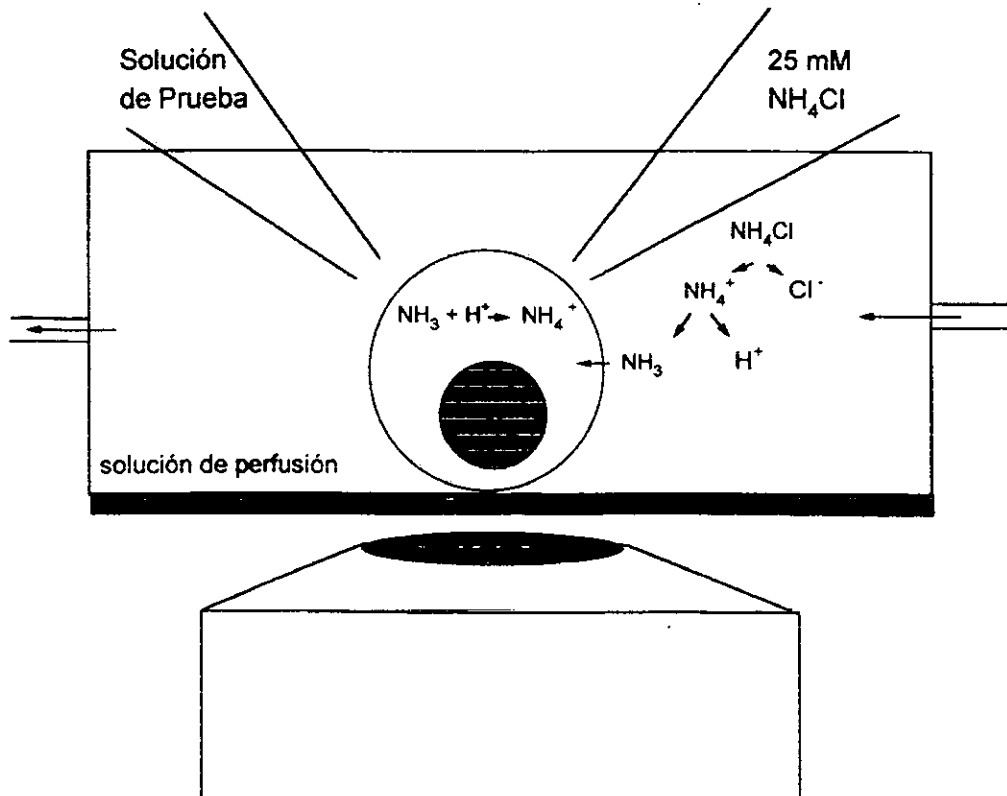


Fig. 14 Esquema que ilustra el método de alcalinización intracelular. Una de las pipetas libera sobre la (o las células) en estudio el NH_4Cl . Este se disocia dando $\text{NH}_3 + \text{H}^+$. El NH_3 pasa a través de la membrana celular y una vez dentro de la célula capta protones y la alcaliniza.

aseguramos que la corriente sea linealmente proporcional a la conductancia iónica que es motivo de nuestro estudio. En la técnica de FVCC, se utiliza una sola micropipeta para medir en forma continua el voltaje y aplicar al mismo tiempo la corriente necesaria para mantener dicho voltaje constante. Para implementar esta técnica una pipeta pulida y de baja resistencia se sella mediante succión a la superficie de la membrana. Luego se rompe el sello, usando para ello diferentes técnicas, de tal forma que el interior celular queda en continuidad eléctrica con el interior de la pipeta. Esto es equivalente a una pipeta intracelular de muy baja resistencia (1-10 Mohm). Un circuito de fijación de voltaje controla el voltaje en el interior de la pipeta (ver fig. 15). El voltaje (V_p) registrado en el interior de la pipeta es la suma del potencial de membrana (V_m), el cual queremos controlar, y la caída de voltaje a través de la pipeta dada por la corriente que fluye a través de ella. La corriente que pasa a través de la resistencia en serie (R_s), dada por la suma de la resistencia de la punta de la pipeta más la resistencia residual del sello roto (también llamada resistencia de acceso R_a), con frecuencia es lo suficientemente grande como para introducir errores significativos en el voltaje. Existen técnicas para compensar estos errores pero ninguna es perfecta y no se logra una compensación del 100% permaneciendo un cierto valor residual de resistencia en serie que constituye la resistencia efectiva (R_{eff}). Evidentemente esta técnica no puede usarse para registrar corrientes muy grandes.

La resolución temporal de esta técnica también se ve afectada por R_{eff} . La constante de tiempo que nos permite resolver corrientes es el producto de R_{eff} (asumiendo que la R de la membrana, R_m , es mucho mayor) por la capacidad de la membrana C_m ($\tau = R_{eff} \cdot C_m$). Por lo tanto esta técnica está limitada a células pequeñas en las cuales este producto es lo suficientemente pequeño como para alcanzar la resolución temporal deseada (fig. 15).

El dispositivo experimental que usamos para implementar esta técnica fue el siguiente: un amplificador Axopatch 1-D (Axon Instruments) se conectó a una pipeta de vidrio a través de un electrodo de plata clorurada y el baño se conectó a tierra a través de un pellet de plata clorurada. La composición del medio de registro en mM fue: 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES, 5 glucosa y 10 CaCl₂, pH 7.35.

La composición de la solución de la pipeta en mM fue: 110 CsMe, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-BAPTA, 4 Mg-ATP, 10 fosfocreatina y 5 CsHEPES, pH= 7.39. El potencial de unión, es decir la diferencia de potencial que existe entre las soluciones intrapipeta y extracelular fue < 5 mV (potencial de la pipeta negativo con respecto al baño). Los voltajes no se corrigieron por el potencial de unión lo cual no afecta las conclusiones de los estudios realizados. El alto Cs^+ interno se utilizó para bloquear las corrientes salientes de K^+ .

Se realizaron experimentos control en los que no se utilizó F^- en la solución interna obteniéndose corrientes prácticamente idénticas a las que se ven en presencia de F^- . Esto indica que las corrientes de Ca^{2+} registradas no se vieron afectadas por la baja concentración de F^- utilizada.

Las resistencias de las pipetas oscilaron en un rango de 2-5 Mohm. Las resistencias de los sellos no se determinaron rutinariamente. La resistencia de entrada de las células, medida a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV y compensando la resistencia en serie $>50\%$, fue de 792 ± 0.08 Mohm, $n=12$). Los registros se filtraron a 2 kHz mediante un filtro Bessel de 4 polos, se digitalizaron y almacenaron en la memoria de la computadora. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23°C).

Rutinariamente se compensó la capacitancia de la pipeta previa ruptura del sello. Una vez establecida la configuración de célula completa, se fijó un potencial de mantenimiento de -80 mV y se compensó más de un 50% la resistencia en serie. Se determinó rutinariamente la capacidad de cada una de las células registradas realizando la integración digital del transitorio capacitivo obtenido a partir de pulsos breves depolarizantes de 20 mV de amplitud (ver resultados), y promediando dichos pulsos. Sólo se incluyeron en el análisis las células que mostraron un adecuado control de voltaje. Para obtener las curvas I-V y las curvas de inactivación se utilizaron protocolos estándar que se detallarán con cada experimento mostrado. Se utilizó el protocolo p/4 para minimizar la corriente de fuga y la corriente capacitiva. Los pulsos se generaron y los datos se adquirieron con un computador AT-486/50 MHz mediante el programa PCLAMP 5.51.

La mayoría de los registros que se mostrarán corresponden a espermatocitos primarios en etapa de paquiteno y a sinplastos de paquiteno. También se observaron corrientes con las mismas características en sinplastos de espermátides redondas.

Los datos se analizaron utilizando rutinas de los programas CLAMPFIT y ORIGIN.

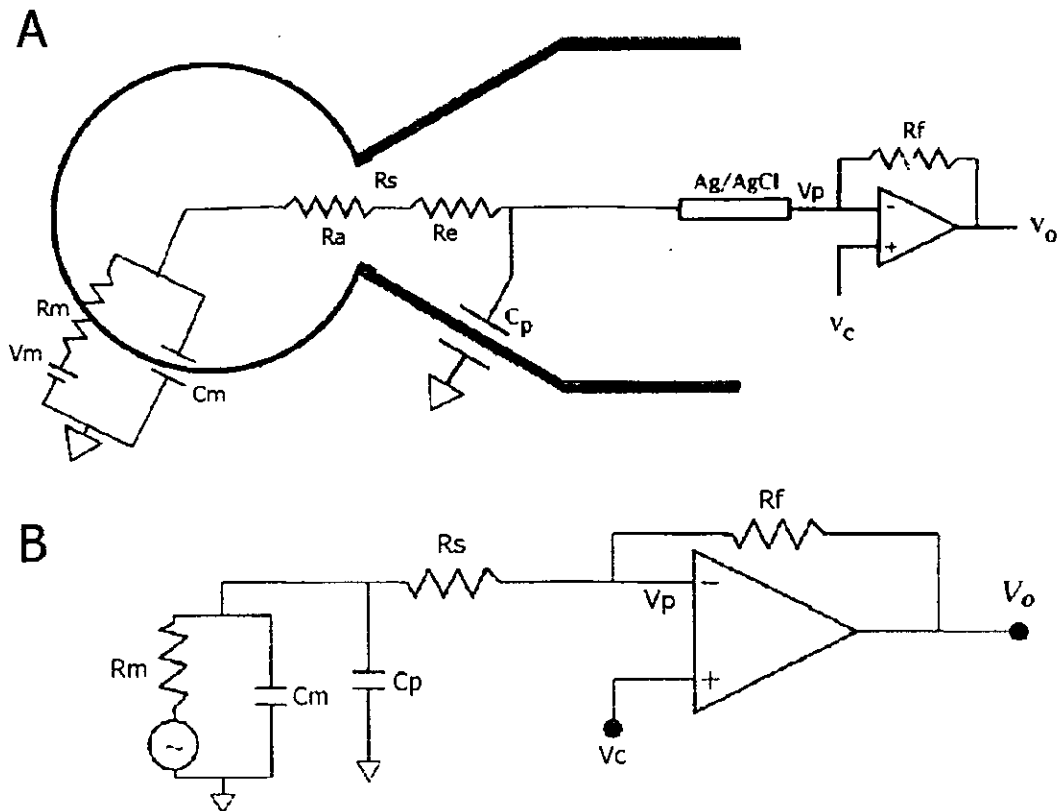


Fig. 15 Esquema del dispositivo empleado para la fijación del voltaje en célula completa. A: Representación de la célula y de la pipeta de registro. Ag/AgCl: Electrodo de plata clorurado; V_p : Potencial de la pipeta; V_c : Potencial comando; V_o : Potencial de salida; R_f : Resistencia de retroalimentación; C_p : Capacitancia de la pipeta; R_e : Resistencia del electrodo; R_a : Resistencia de acceso; R_s : Resistencia en serie (R_e+R_a); C_m : Capacidad de la membrana. R_m : Resistencia de la membrana. **B:** Circuito eléctrico simplificado. El amplificador operacional de alta ganancia posee una entrada inversora (-) y otra no inversora (+). V_c se aplica a la entrada (+) y el amplificador pasa corriente a través de R_f para hacer $V_p=V_c$. El amplificador es de alta impedancia, por lo cual no drena corriente en su entrada, de modo que la corriente que fluye por R_f será igual a la corriente a través de la membrana, pero de signo opuesto. La diferencia entre V_o y V_c (medida con un amplificador diferencial que no se muestra) es proporcional a la corriente que fluye a través de R_m .

IV RESULTADOS

Parte A: Cambios de pHi y transitorios de Ca²⁺ inducidos por la alcalinización intracelular en células espermatoogénicas

Cambios en el pH intracelular (pHi) producidos durante la aplicación de NH₄Cl.

En primer lugar quisimos ver cómo respondían las células espermatoogénicas frente a la liberación rápida de 25 mM de NH₄Cl aplicado con una pipeta de microperfusión colocada en las proximidades de la o las células en estudio y cómo era el curso temporal de dicha respuesta.

Para ello medimos los cambios de fluorescencia a una sola λ (505 nm) en células cargadas con 10 μ M de BCECF AM durante la aplicación de 25 mM de NH₄Cl. La fig. 16 ilustra los efectos de perfusión durante 30 s de 25 mM de NH₄Cl en 4 células espermatoogénicas (2 espermátides redondas y 2 paquitenos). El aumento en el cociente $\Delta F/F_0$ es equivalente a un aumento en el pHi. Como se observa en la fig. 16 el pHi aumenta rápidamente, y en 7 segundos alcanza una meseta que se mantiene durante la aplicación del NH₄Cl. Después de lavar el NH₄Cl, el pHi regresa monotónicamente al valor basal. Las fases de decaimiento de estos registros se ajustan bien a exponenciales simples con constantes de decaimiento de 11.38, 11.87, 9.04 y 9.89 segundos. En estas condiciones no observamos acidificación durante ni después de la aplicación de NH₄Cl.

Para realizar las medidas cuantitativas del pHi en células espermatoogénicas, medimos el pH en células cargadas con 4 μ M de BCECF durante 10 minutos a dos λ (ver métodos). En primer lugar medimos el pH basal en los diferentes tipos celulares y observamos que los valores varían entre 6.0-7.2. Estos valores son muy similares a los reportados para espermatozoides de carnero y cerdo (6.3 a 6.7; Babcock y Pfeiffer, 1987; Tajima, y col., 1987). No encontramos diferencias significativas entre células en diferentes etapas de diferenciación (ver tabla 1).

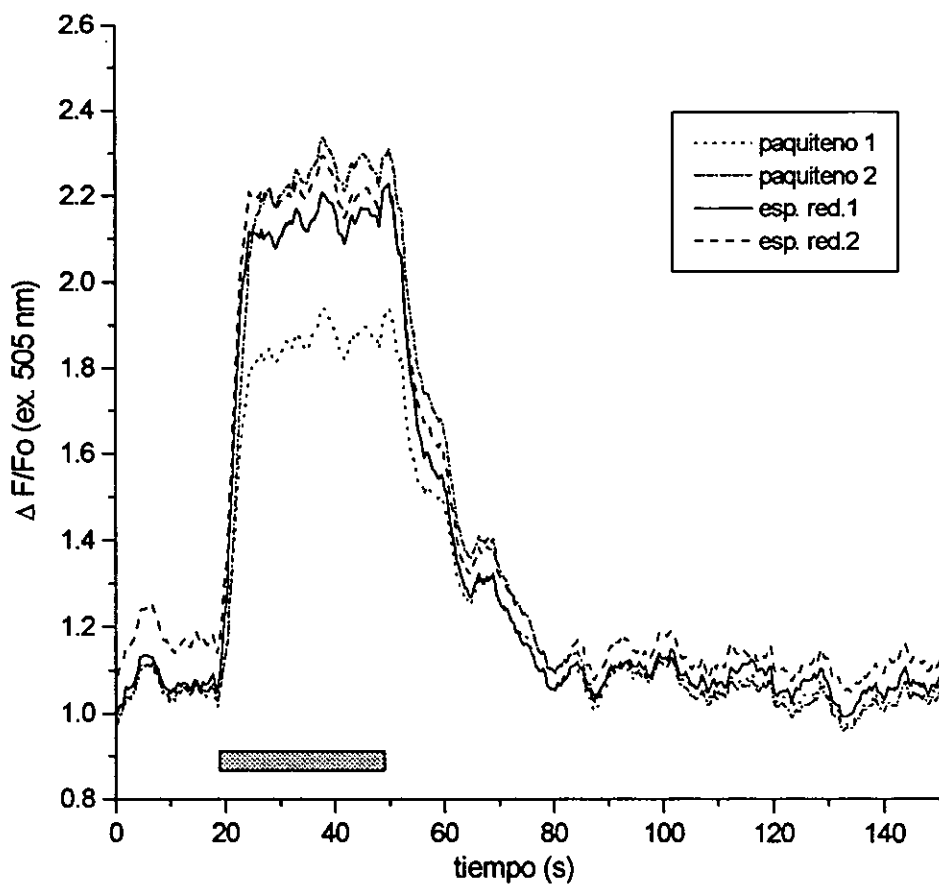


Fig. 16 Curso temporal de la alcalinización intracelular inducida por NH_4Cl en dos espermatocitos en paquiteno y dos espermátides redondas. Las células se incubaron con $10 \mu\text{M}$ BCECF-AM durante 20 min. El pH intracelular se monitoreó como cambios en la fluorescencia de emisión del BCECF (ver métodos). La duración del pulso de NH_4Cl se indica mediante la barra horizontal. El pH_i de todas las células aumenta rápidamente luego de la exposición al NH_4Cl , alcanzando una meseta en aprox. 7 segundos. Luego de remover el NH_4Cl el pH_i decae monóticamente a los valores de reposo sin observarse una acidificación de rebote.

Tabla 1. Valores de pHi basales

disoc. pH 7.35			disoc. pH 7.7		
paquitenos	esp. red.	esp. cond.	paquitenos	esp. red.	esp. cond.
6.53 0.04 n=34	6.34 0.04 n=55	6.33 0.07 n=11	6.74 0.06 n=18	6.63 0.04 n=42	6.64 0.09 n=2

disoc. pH 7.35 (1)	disoc. pH 7.65 (2)	disoc. pH 7.7 (3)
6.40 0.03 n=100	6.57 0.03 n=103	6.66 0.03 n=62

(1) vs (2) = $p= 1.4 \cdot 10^{-5}$

(1) vs (3) = $p= 2.1 \cdot 10^{-8}$

(2) vs (3) = $p= 1.5 \cdot 10^{-11}$

En segundo lugar observamos que la aplicación de 25 mM de NH_4Cl produce un aumento de pHi de 1.35 ± 0.11 unidades de pH , $n = 13$. Este aumento de pH es dependiente de la concentración de NH_4Cl utilizada como se puede claramente observar en la fig. 17 donde 5 mM de NH_4Cl produce un aumento de 0.85 ± 0.04 unidades de pH y NH_4Cl 15 mM uno de 1.06 ± 0.06 unidades de pH (fig. 17). En contraste con otros tipos celulares que muestran una acidificación luego de alcanzar el pico de alcalinización y una acidificación rebote al retirar el NH_4Cl del medio, estas células no mostraron ningún tipo de acidificación con los pulsos de NH_4Cl utilizados en los experimentos (ver fig. 17). Esto sugiere que la membrana plasmática de las células espermatogénicas carece de una permeabilidad considerable a NH_4Cl (Bevensee y Boron, 1995).

Experimentos control mostraron que el curso temporal y la amplitud de la alcalinización inducida por NH_4Cl y registradas con BCECF no se ven afectadas si las células se incuban previamente con Fura 2-AM (no se muestran estos datos).

Cambios en la concentración de Ca^{2+} inducidos por la alcalinización intracelular.

En primer lugar se midió la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en los distintos tipos celulares. Encontramos que las concentraciones de Ca^{2+} de las células en reposo varían significativamente entre células en diferentes etapas de diferenciación (a diferencia de lo que sucede con los valores de pHi basal). Los mayores valores de Ca^{2+} basales se encontraron en las etapas de maduración más avanzadas. Las células en etapa de paquiteno tuvieron una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promedio de 56.5 ± 7.2 nM ($n = 10$); las espermátides redondas de 122.2 ± 13.8 nM ($n = 19$) y las espermátides condensadas de 200.2 ± 46.3 nM ($n = 5$). Estas diferencias ($p < 0.02$), podrían estar relacionadas con los procesos de diferenciación y maduración de las células espermatogénicas (fig. 18). El Ca^{2+} basal permanece estable durante períodos de observación de hasta 30 minutos, lo cual sugiere la ausencia de flujos netos espontáneos de Ca^{2+} bajo nuestras condiciones de registro.

Al alcalinizar el medio intracelular con un pulso de 25 mM de NH_4Cl en todos los tipos celulares estudiados se produce una respuesta bifásica característica, con 2

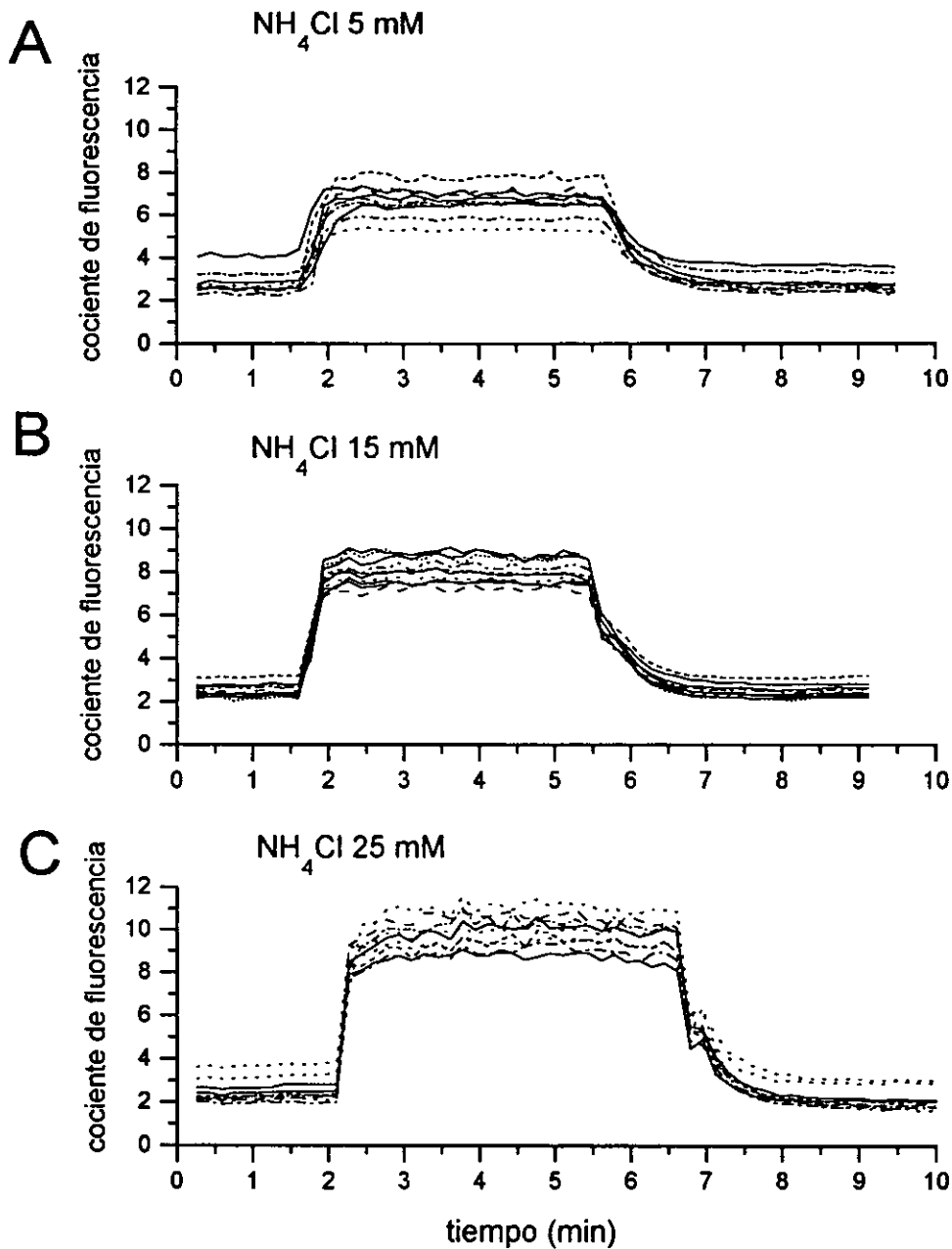


Fig. 17 Cambios de pH producidos en 7 células espermatogámicas a diferentes concentraciones de NH_4Cl . **A:** 5 mM, **B:** 15 mM y **C:** 25 mM. El pH se monitoreó como el cociente entre las fluorescencias del BCECF a 440/500 nm (ver métodos). A medida que aumenta la $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ utilizada, se produce un mayor aumento en los cocientes de fluorescencia.

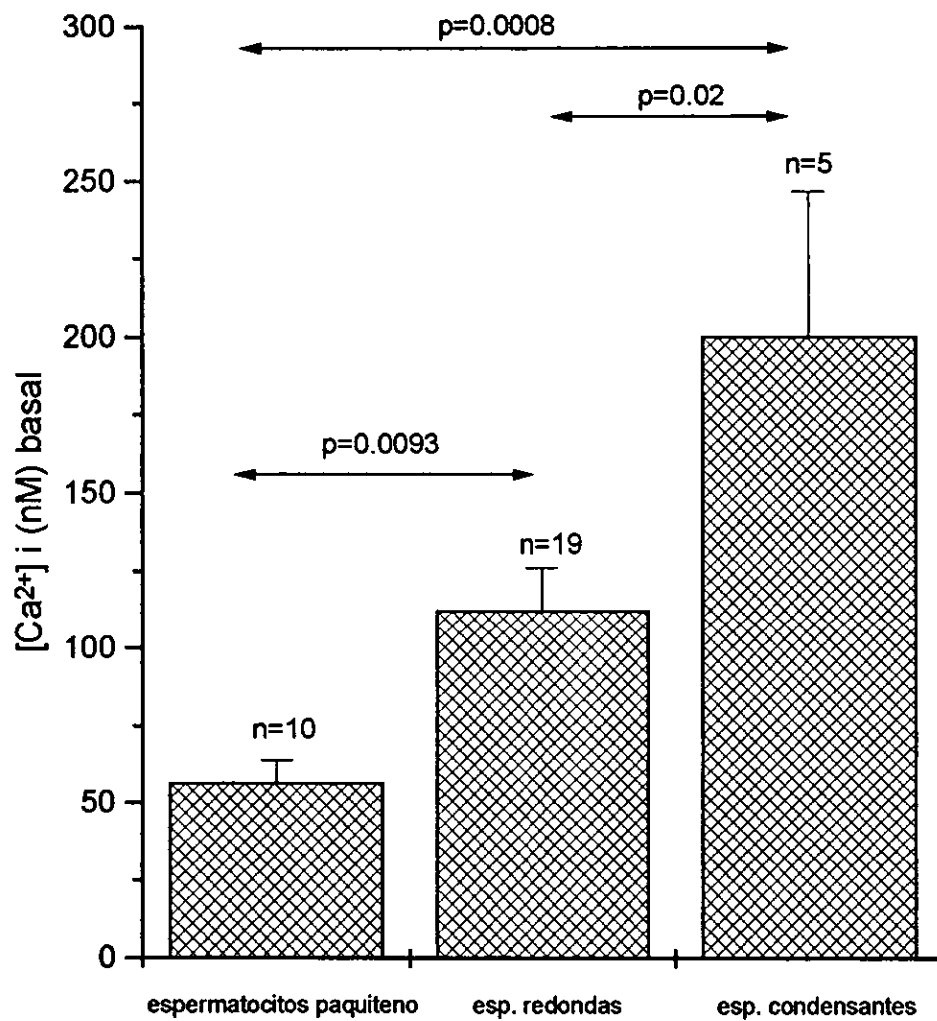


Fig. 18 Concentraciones de Ca^{2+} basales en los diferentes tipos de células espermatogénicas. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal es significativamente mayor en las células más diferenciadas.

componentes: un componente inicial que consiste en una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, seguido de un componente más tardío que consiste en un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (ver fig. 19). Si bien estos 2 componentes se presentan en todos los tipos celulares estudiados, la magnitud de los mismos, varía según la etapa de diferenciación celular e incluso se observan variaciones en una misma célula con la aplicación sucesiva de pulsos de NH_4Cl idénticos (ver más adelante). A los efectos de comprobar que éste es un efecto de la alcalinización y no un efecto de una posible depolarización producida por la permeación del ion NH_4^+ a través de canales de K^+ , se realizaron dos controles: 1) se reemplazó el NH_4Cl equimolarmente por KCl y se observó que la aplicación de éste último no causa ningún cambio apreciable en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células espermatogénicas. 2) se alcalinizó intracelularmente con otra base débil, cloruro de trimetilamina TMACl (25 mM), y se observó que ésta también es capaz de inducir una respuesta bifásica muy similar a la producida por el NH_4Cl , así como el fenómeno de facilitación (fig. 20).

También podría argumentarse que tal vez la respuesta observada no fuese debida a la alcalinización intracelular *per se* sino a una disminución en la $[Na^+]_e$ (en 25 mM). Esto podría traer como consecuencia un cambio en el potencial de equilibrio del intercambiador Na^+/Ca^{2+} favoreciendo su modo de acción reverso (es decir sacando Na^+ y metiendo Ca^{2+} a la célula). Para descartar esta posibilidad sustituimos el NH_4Cl equimolarmente por cloruro de N-metil-glucamina (NMGCl), de tal manera de reducir la $[Na^+]_e$ en la misma proporción sin producir alcalinización. Como se ve en la fig. 21 esta maniobra no produce ningún cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Es decir, para producir respuestas de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es necesario el cambio de pH_i .

Otra de nuestras preocupaciones fue ver si los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la alcalinización intracelular eran un efecto real o un artefacto debido al posible efecto del pH sobre las propiedades fisicoquímicas del Fura (efecto sobre la K_d del Fura) (Martínez-Zaguilán, y col., 1991, 1996). Sin embargo, es poco probable que éste sea el caso dado que, como se verá más adelante, las medidas de $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron dentro de un rango de valores de pH_i en el cual las propiedades del Fura-2 son independientes del pH (Batlle, y col., 1993; Nitschke y col., 1996). Por otra parte, el uso de maniobras experimentales que modifican o eliminan por completo los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la

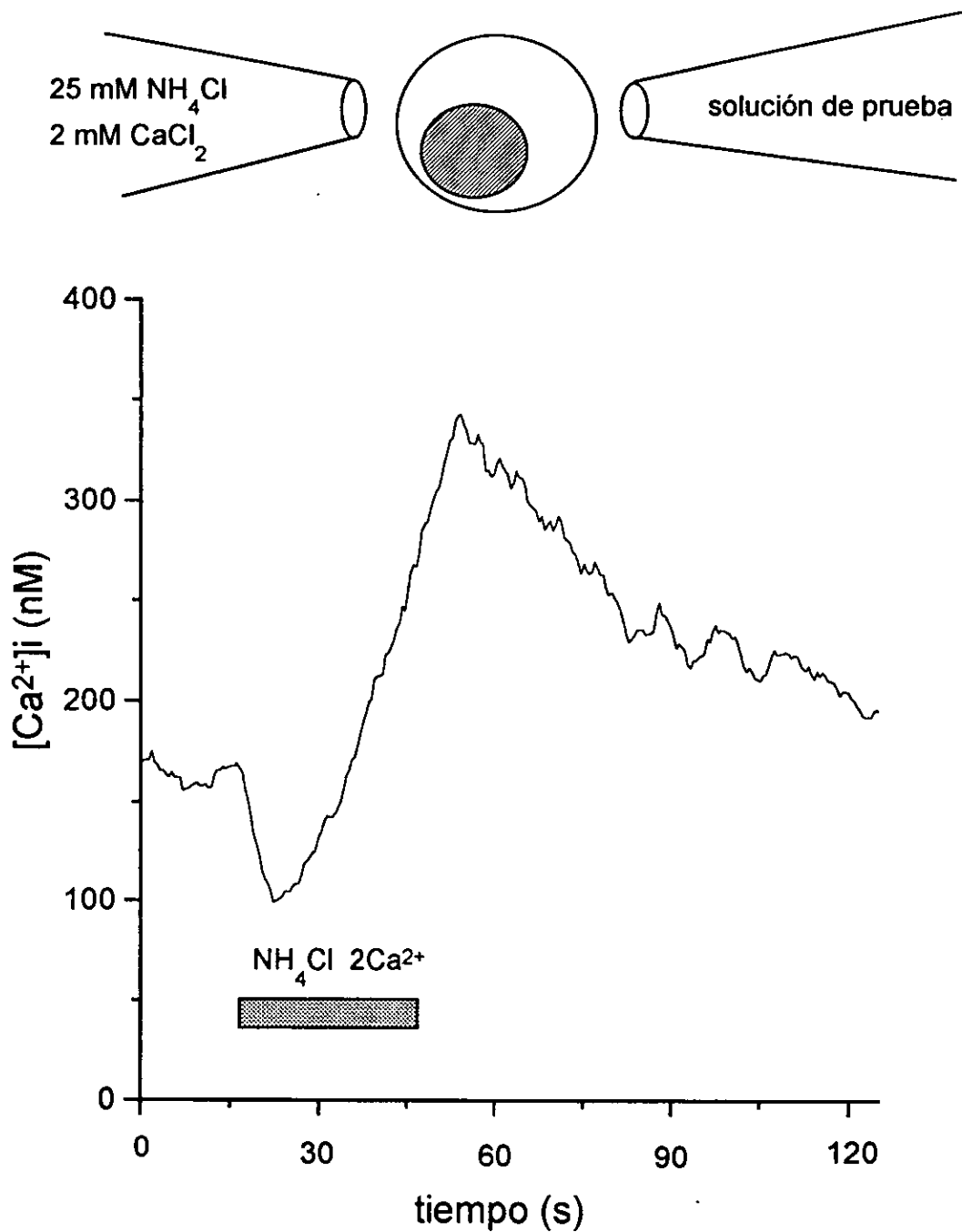


Fig. 19 Cambios bifásicos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la alcalinización intracelular en células espermatogénicas aisladas. El diagrama representa una célula cargada con Fura-2 AM de la cual se obtuvo el registro, así como la localización de la pipeta con el NH_4Cl que se usó para producir la alcalinización intracelular. Se utilizaron una o más pipetas para aplicar otras soluciones o drogas. La barra horizontal representa la duración del pulso de NH_4Cl .

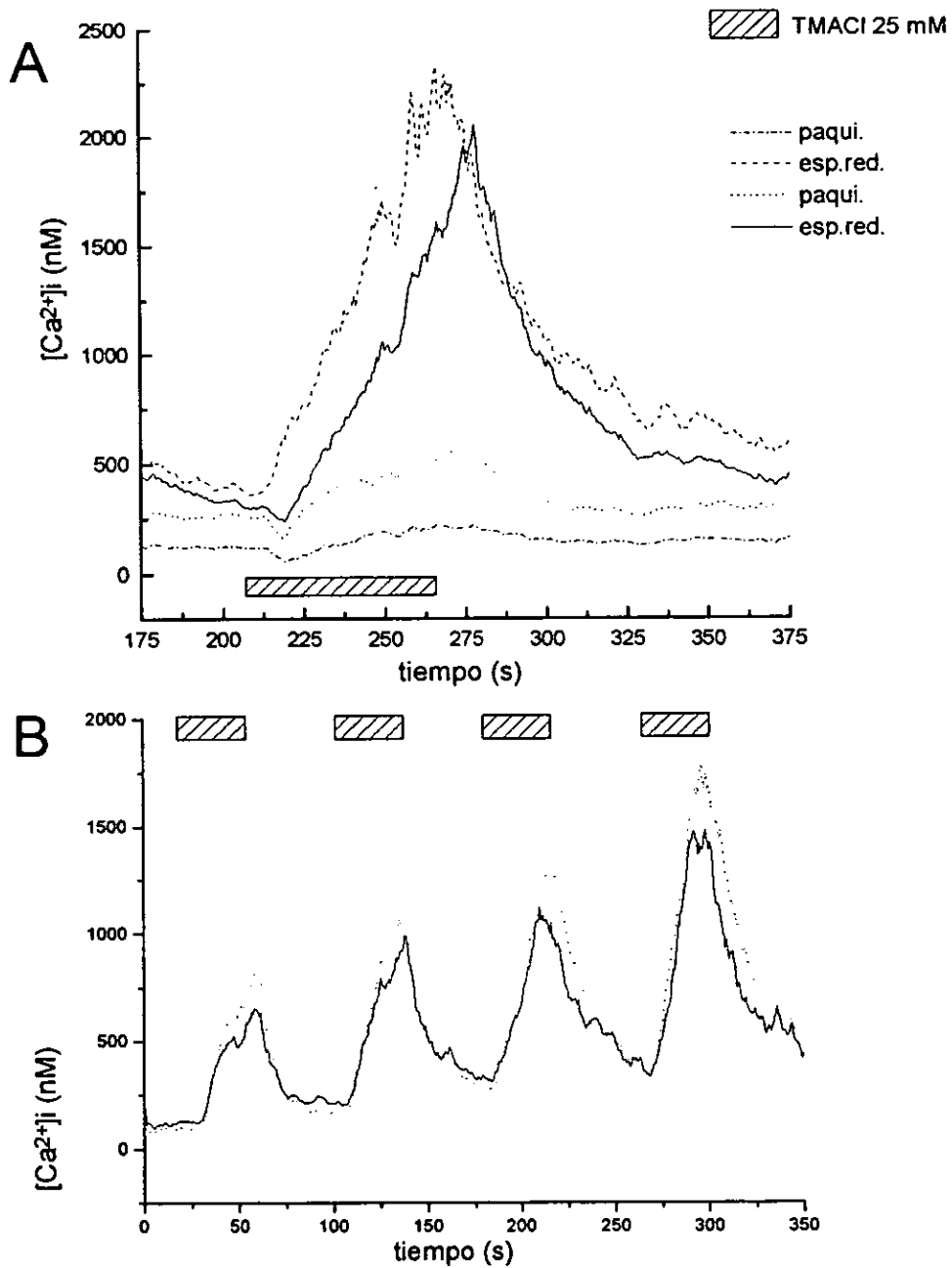


Fig. 20 Respuestas a 25 mM TMACl. A: respuesta a la aplicación de 25 mM TMACl de 60 s de duración en dos células paquitenas y dos espermatídes redondas. El TMACl reproduce la típica respuesta caracterizada por una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ seguida de un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. B: respuestas a cuatro pulsos sucesivos de 25 mM TMACl de 60s de duración (indicados por las barras horizontales) en dos espermatídes redondas en donde se ve el fenómeno de facilitación del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$.

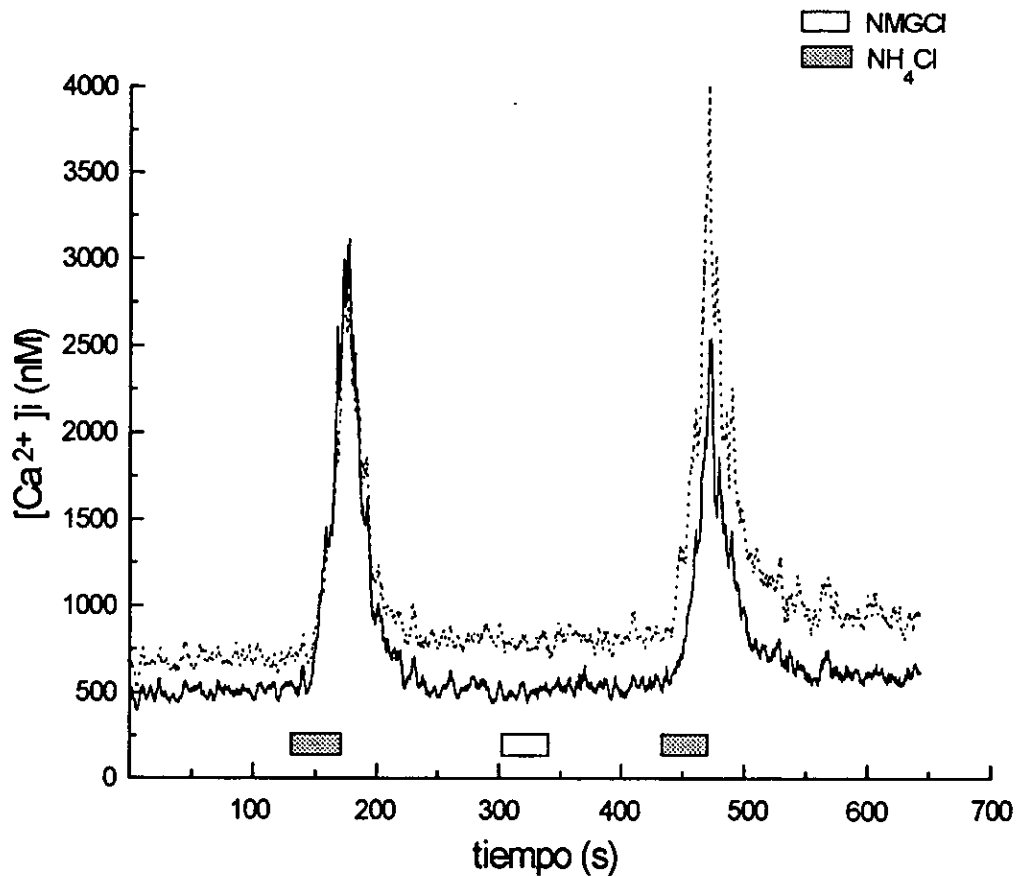
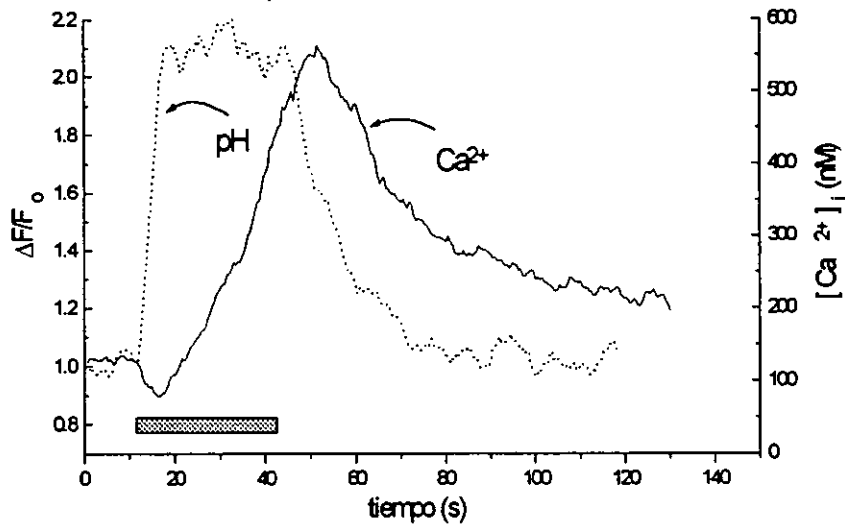


Fig. 21 Efecto de 25 mM N-metil-glucamina (NMG) en dos espermátides redondas. Estos experimentos confirman que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se debe al cambio de pH_i y no a una disminución de la $[Na^+]_e$ extracelular. En dos espermátides redondas se dan dos pulsos de 25 mM de NH_4Cl durante los cuales se ve el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Entre estos dos pulsos se aplica 25 mM de NMGCl con la cual disminuye la $[Na^+]_e$ en 25 mM sin que exista un cambio concomitante de pH . La remoción de 25 mM $NaCl$ no produce los mismos cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ que la aplicación de NH_4Cl .

alcalinización, sirven para descartar una influencia significativa del pH sobre las propiedades de unión del Fura-2. En la fig. 22 se comparan el curso temporal de las respuestas de Ca^{2+}_i y de pHi en dos células diferentes (ambos espermátocitos en paquiteno). Como puede observarse el curso temporal de ambas respuestas es claramente diferente. Para realizar una comparación cuantitativa se midieron parámetros cinéticos como el tiempo medio de subida ($t_{1/2}$) de ambas señales así como la constante de decaimiento (τ). En la tabla se muestran los valores de ambos parámetros para las dos variables y para los distintos tipos celulares. Tanto los $t_{1/2}$ como las τ son muy diferentes para ambas señales, siendo los $t_{1/2}$ de subida 3 veces más rápidos para las señales de pHi que para los transitorios de Ca^{2+} . Por otro lado las τ de la señal de pH son similares en todos los tipos celulares, mientras que los transitorios de Ca^{2+} tienen un decaimiento más lento en las células más maduras. Dado que los efectos de la alcalinización sobre la K_D del Fura-2, deberían ser inmediatos, las diferencias cinéticas entre los transitorios de Ca^{2+} y las señales de pHi sugieren que la fase de subida de la Ca^{2+}_i es una respuesta fisiológica genuina.

Como se dijo anteriormente, si bien todas las células estudiadas presentan un cambio bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ frente a la alcalinización intracelular, existen diferencias entre ellas. Como se puede ver en la fig. 23, el primer componente de disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ es más evidente en las células más inmaduras (espermátocitos en paquiteno) que en las espermátides redondas y en las condensadas. Lo contrario ocurre con la fase lenta de subida de la $[Ca^{2+}]_i$ la cual es más evidente en las etapas de maduración más avanzadas o sea en las espermátides condensadas y espermatozoides testiculares. En estos últimos la alcalinización intracelular con 25 mM de NH_4Cl es capaz de producir también un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ como se ilustra en la fig. 24.

A su vez en una misma célula, pulsos de NH_4Cl idénticos aplicados en forma sucesiva van determinando un aumento progresivo del componente de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Se produce así una facilitación de la respuesta. En la fig. 25, obtenida de un espermátocito en paquiteno, se muestra que la magnitud de la fase de subida de la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta con pulsos sucesivos de NH_4Cl de igual duración. En la parte B de la fig. 25 se alinearon 4 pulsos sucesivos de NH_4Cl para facilitar la comparación entre los mismos.



tipo celular	$t_{1/2}$ pH	$t_{1/2}$ Ca	τ pH	τ Ca
paquiteno	29 ± 0.2	9.8 ± 1.6	9.9 ± 0.9	12.9 ± 2.9
esp. red.	2.4 ± 0.2	10.6 ± 3.1	9.8 ± 0.2	24.6 ± 8.2
esp. cond.	4.5 ± 0.4	15.3 ± 2.9	8.9 ± 0.7	—

Fig. 22 Trazos representativos de la $[Ca^{2+}]_i$ y de pH_i obtenidos de dos espermatoцитos en paquiteno diferentes cargados con BCECF y Fura-2 respectivamente. Los trazos están superpuestos para poder compararlos. Nótese que la caída inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ ocurre en forma simultánea con el aumento de pH_i , mientras que el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ aparece posteriormente con cierto retraso. En la tabla se indican los tiempos medios de subida ($t_{1/2}$) y la constante de decaimiento (τ) de las señales de Ca^{2+} y pH en las distintas etapas de maduración de las células espermatoгénicas.

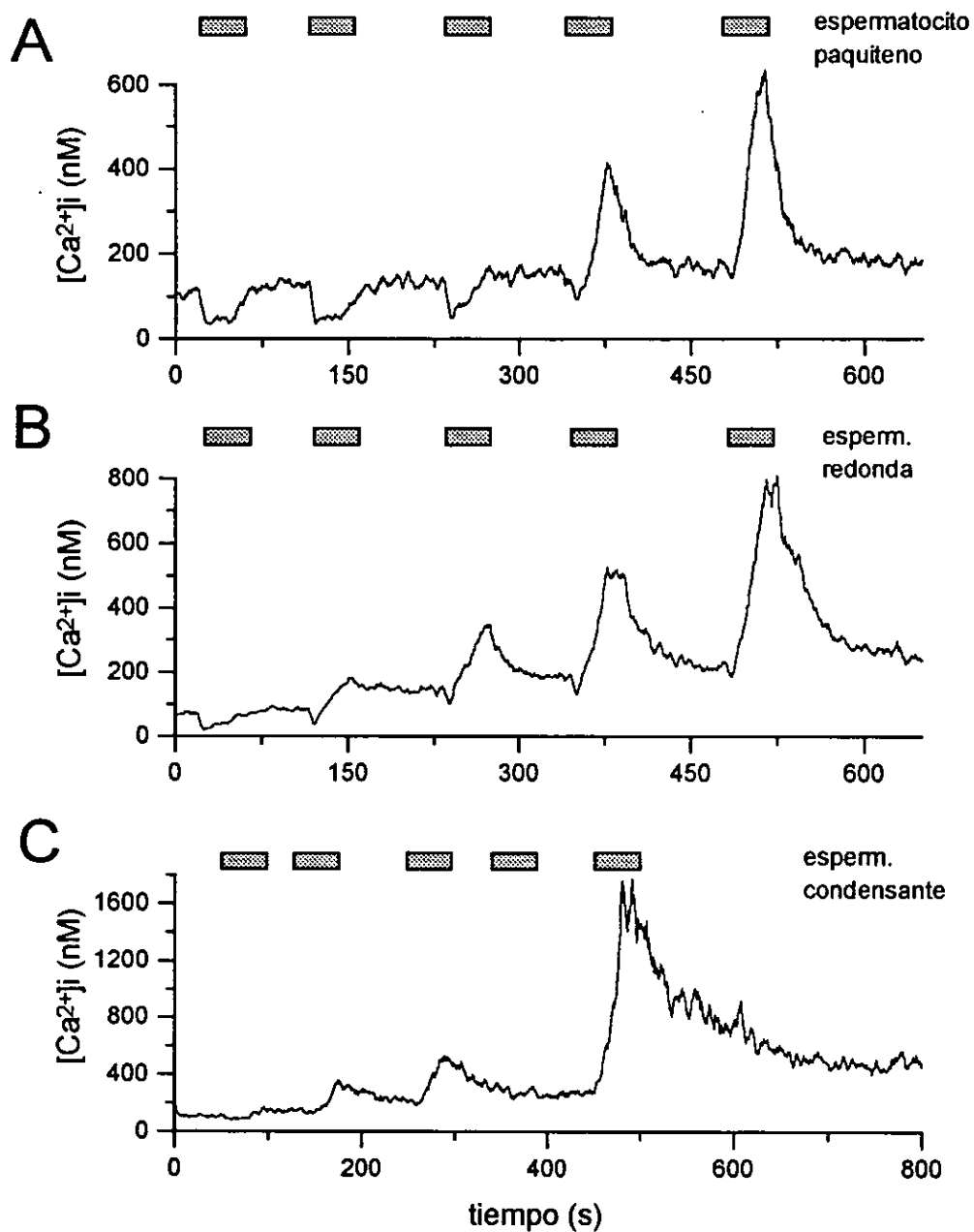


Fig. 23 Transitorios de Ca^{2+} en células espermatogénicas en distintas etapas de maduración, producidos por pulsos sucesivos de NH_4Cl . **A:** espermatocono paquiteno, **B:** espermátide redonda, **C:** espermátide condensada. Véase que la primera aplicación de NH_4Cl produce una caída de la $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatocono paquiteno, la cual es menos evidente en la espermátide redonda y está virtualmente ausente en la espermátide condensada. Asimismo véase que la magnitud del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en todas las células examinadas aumenta con las sucesivas aplicaciones de NH_4Cl .

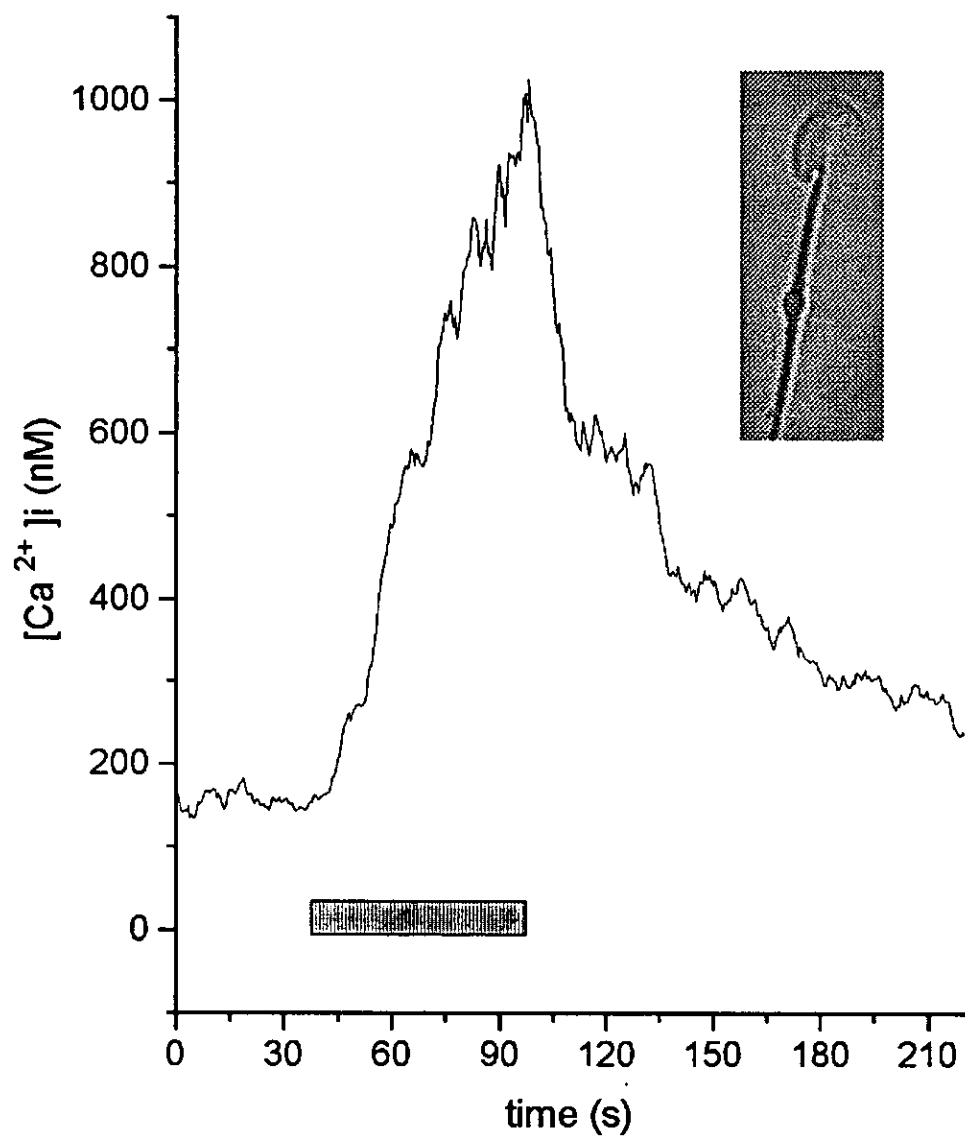


Fig. 24 Transitorios de Ca^{2+} registrados en la cabeza de un espermatozoide testicular similar al que se ilustra en el inserto. La barra horizontal representa la duración del pulso de NH_4Cl . Esta respuesta se obtuvo después de la primera aplicación de NH_4Cl .

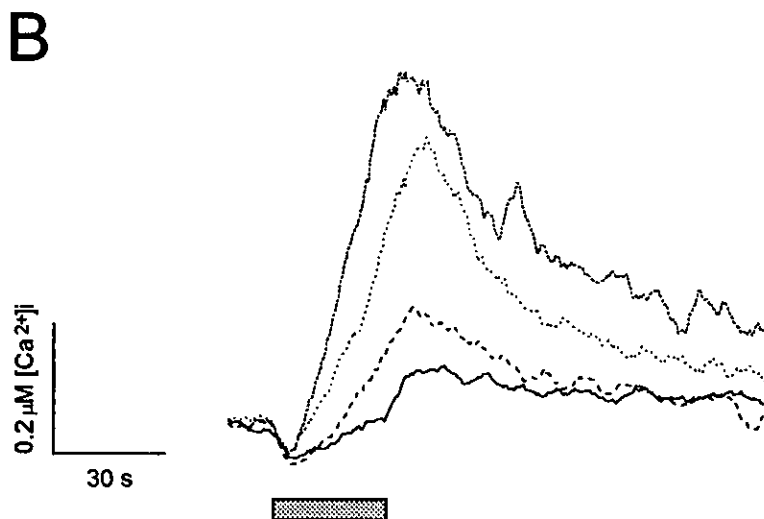
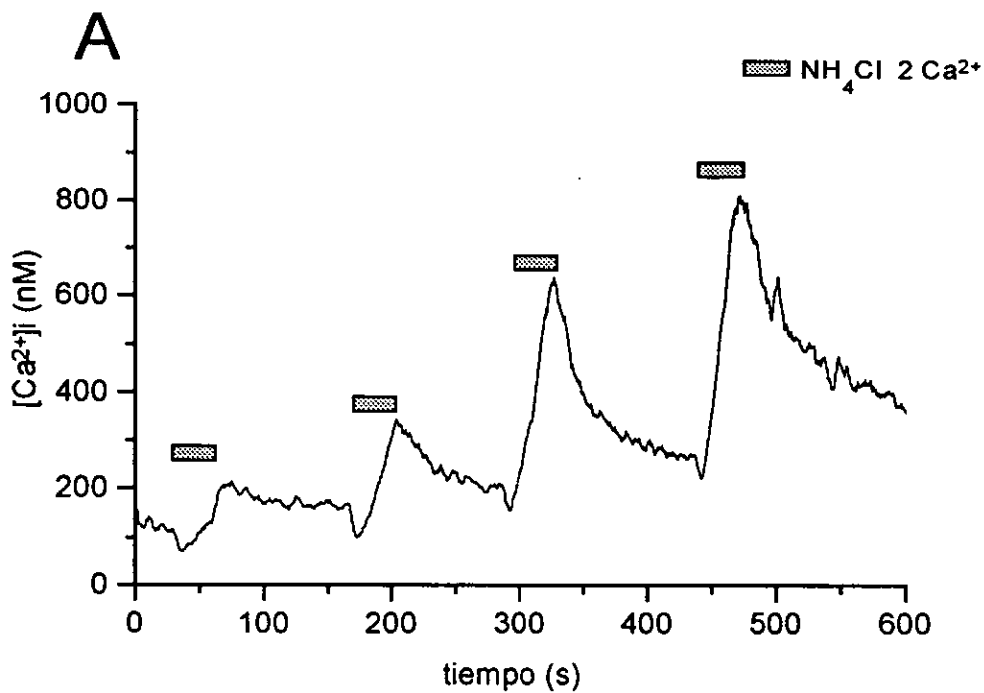


Fig. 25 Facilitación de los transitorios de Ca^{2+} i. A: aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un espermatozoido en paquitenio. Se observa claramente la facilitación uso-dependiente luego de aplicaciones repetidas de NH_4Cl (indicadas por las barras horizontales). No sólo los transitorios de Ca^{2+} i se hacen más grandes, sino que también la fase de subida se hace más rápida. A su vez el decaimiento de los transitorios se hace más lento luego de alcalinizaciones intracelulares repetidas. B: Respuestas superpuestas a las aplicaciones de NH_4Cl tomadas de la figura A. Los trazos se alinearon en forma vertical y horizontal. Como puede verse la magnitud de la caída inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanece incambiada, y es progresivamente enmascarada por el aumento tardío de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Como se puede apreciar claramente este fenómeno de facilitación uso-dependiente determina la desaparición gradual de la fase de caída inicial de la $[Ca^{2+}]_i$. También se destaca la ausencia de facilitación en este primer componente. Si bien la variabilidad del fenómeno de facilitación dificulta la cuantificación de las respuestas a diferentes concentraciones de NH_4Cl , es claro que concentraciones crecientes de NH_4Cl producen incrementos mayores de la $[Ca^{2+}]_i$. Esto se aprecia claramente en la fig. 26 en que se determinaron las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ para diferentes concentraciones de NH_4Cl (5, 10, y 15 mM).

Los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por esta alcalinización parecen ser específicos de las células espermatoogénicas del ratón adulto, dado que no se presentan en espermatoogonias procedentes de ratones prepúberes o en otras células ensayadas en condiciones similares como neuronas simpáticas, células cromafines y células hipofisarias de rata. En la fig. 27 se ilustra un pulso de NH_4Cl aplicado a una espermatoogonia obtenida de un ratón de 1 semana de edad, en la cual se produce únicamente el decaimiento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ destacándose la ausencia de la fase lenta de subida de la $[Ca^{2+}]_i$.

Esta disminución inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ presenta las siguientes características: 1) se desarrolla casi concomitantemente con el aumento de pH_i 2) no exhibe facilitación y 3) dura mientras se mantiene la aplicación del NH_4Cl (lo que se hace muy evidente cuando se elimina el componente de aumento en la $[Ca^{2+}]_i$). Pueden postularse distintos mecanismos para explicar esta caída en la $[Ca^{2+}]_i$. Nosotros nos inclinamos por la explicación más sencilla, según la cual luego de entrar a la célula, el NH_3 desplaza H^+ unidos a proteínas que unen Ca^{2+} , determinando que los iones Ca^{2+} se puedan unir ahora a estos sitios disponibles, disminuyendo así la $[Ca^{2+}]_i$.

Umbral de pH_i y facilitación uso-dependiente de la fase de subida de la Ca^{2+}_i

En los experimentos iniciales notamos que la preincubación de las células en un medio un poco más alcalino promueve la aparición de la fase de subida de la $[Ca^{2+}]_i$. Las células incubadas a pH externo (pH_e) = 7.7 tienen un $pH_i = 6.6 \pm 0.03$ ($n = 62$) y reponen a los pulsos de 25 mM de NH_4Cl con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que se presenta

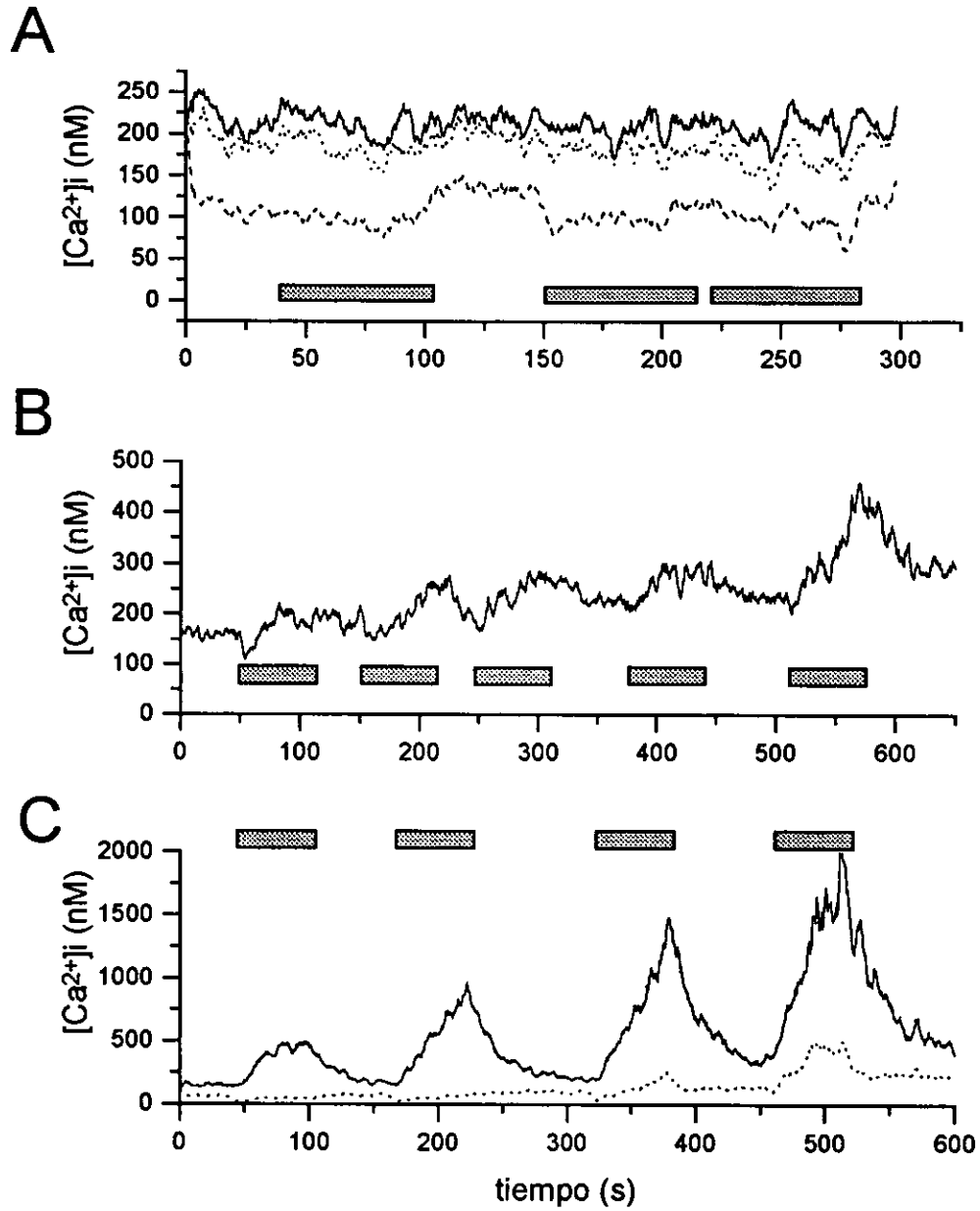


Fig. 26 Respuestas a diferentes concentraciones de NH_4Cl . A: 5 mM, B: 10 mM y C: 15 mM. Las aplicaciones de NH_4Cl se indican con las barras horizontales. Nótese que conforme se aumenta la concentración de NH_4Cl empleada, los aumentos en las $[Ca^{2+}]_i$ son mayores.

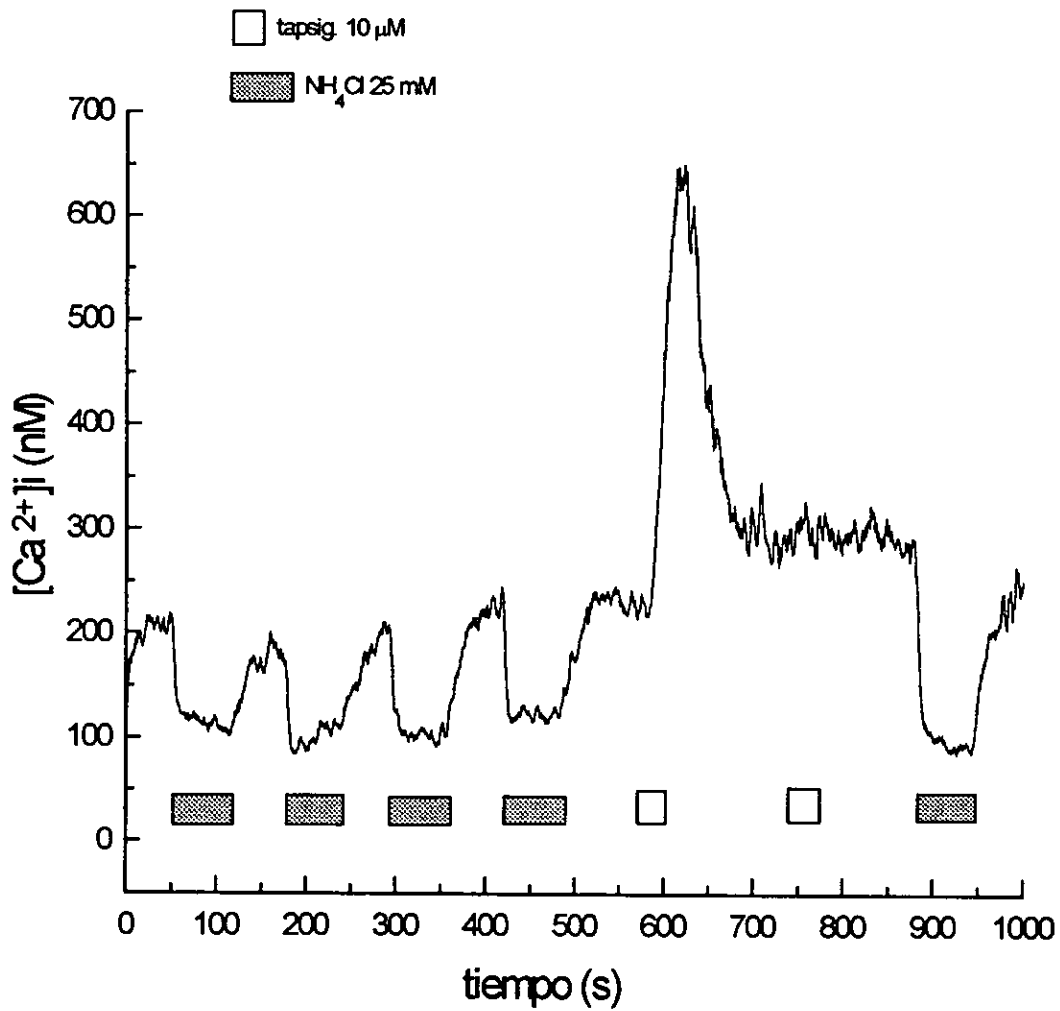


Fig. 27 Respuestas de una espermatogonia a las aplicaciones sucesivas de 25 mM NH_4Cl y a 10 μM tapsigargina (barras llenas y vacías respectivamente). En esta célula no se produce aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la aplicación de NH_4Cl , solamente tiene disminuciones de la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo responde a la aplicación de tapsigargina con un gran aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

con mayor frecuencia que las células disociadas a $pH_e = 7.35$. Estas últimas son significativamente ($p = 2.1 \times 10^{-8}$) más ácidas con un $pH_i = 6.4 \pm 0.03$; $n = 100$ (ver tabla 1), y en las mismas a veces no se observa la fase de subida, presentándose únicamente la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. De acuerdo con estas observaciones nos preguntamos si la aparición de la fase de subida en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por alcalinización se producía más fácilmente al alcanzar el pH_i un valor umbral crítico. Para verificar esta posibilidad acerca de la existencia de un umbral crítico de pH_i que dispare un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por alcalinización, decidimos estudiar los efectos de incubar con monensina las células que no presentaban respuestas al NH_4Cl . La monensina es un ionóforo de Na^+ que intercambia Na^+ externo por H^+ interno dando como resultado una alcalinización intracelular. Con esta maniobra esperábamos comprobar si en estas nuevas condiciones sí se producía un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por alcalinización intracelular. La fig. 28 A y B muestra dos células que inicialmente no respondieron a los pulsos de NH_4Cl . Estas células se incubaron posteriormente durante dos minutos con $20 \mu M$ de monensina. Luego de dicha incubación con el ionóforo las células empiezan a responder con pequeños incrementos en las fases de subida de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la aplicación de NH_4Cl . Luego de una segunda aplicación de monensina durante 4 minutos, las células muestran aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$, así como el fenómeno de facilitación de dicha respuesta. Estos datos sugieren que los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ se empiezan a producir cuando el pH_i basal excede el valor de 6.7 aproximadamente.

Dado que la monensina produce también un aumento en la $[Na^+]_i$, quisimos descartar que su efecto se debiera a esto último y no al aumento de pH_i . Para ello se utilizó ouabaína (glicósido cardiotónico), la cual inhibiendo la bomba Na^+/K^+ -ATPasa produce un aumento de la $[Na^+]_i$ sin cambiar el pH_i . Esta afirmación es válida, siempre y cuando la regulación del pH_i no dependa de la $[Na^+]_i$. En este sentido, cabe aclarar que el espermatozoide de mamífero no posee un intercambiador Na^+/H^+ (Zeng y col., 1996). Como se observa en la fig. 29 la aplicación de $20 \mu M$ ouabaína no produce los mismos efectos que la monensina sobre las respuestas a la alcalinización intracelular.

Por lo tanto, pensamos que se debe alcanzar un valor crítico umbral de pH_i para poder producir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Este hallazgo, como se explicará posteriormente,

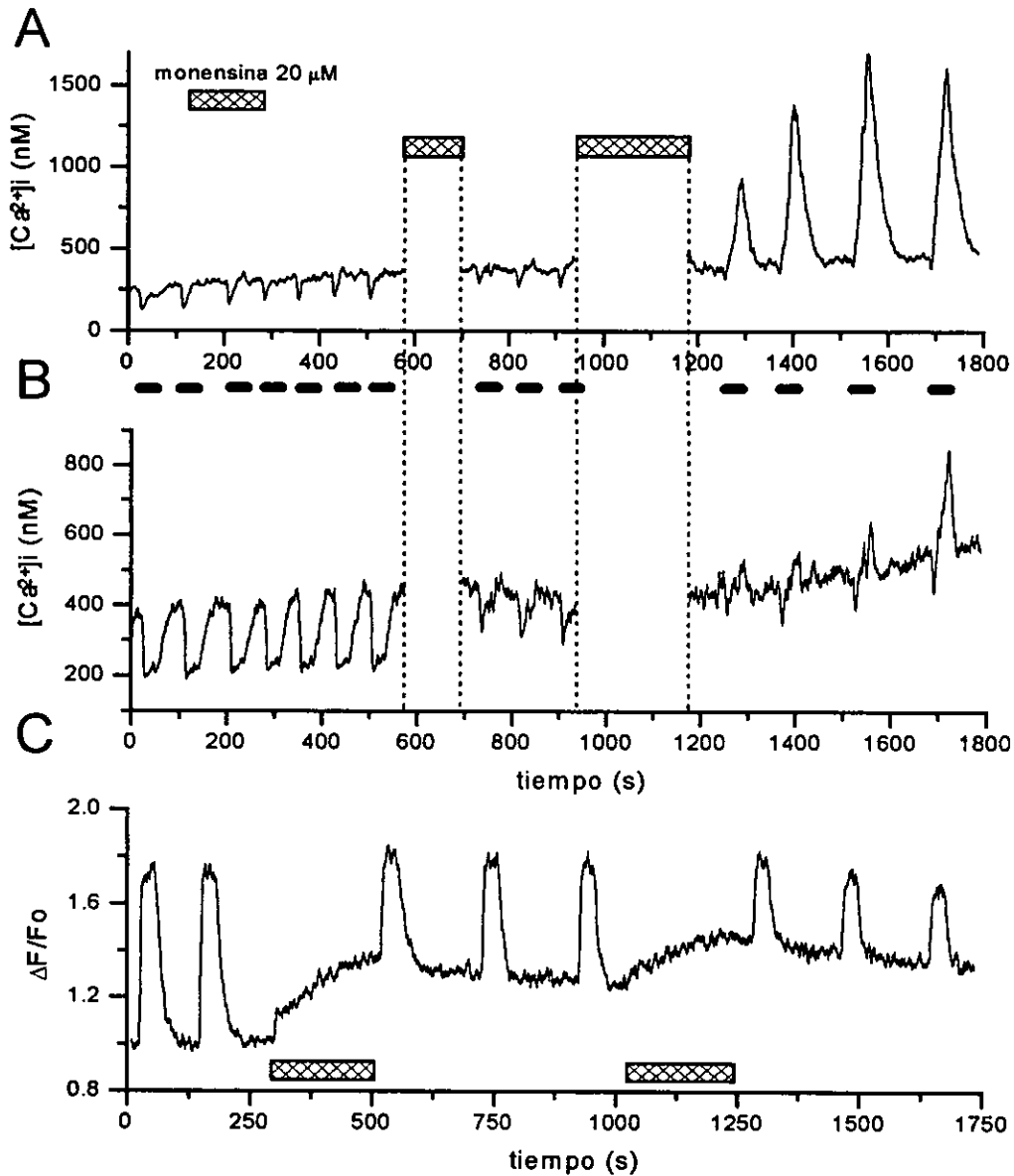


Fig. 28 Transitorios de Ca^{2+}_i luego de la incubación con monensina. **A, B:** Registros obtenidos de dos células espermatógenicas cargadas con Fura-2 que inicialmente no respondían a los pulsos de NH_4Cl con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (barras llenas). Luego de 2 min de incubación con 20 μ M monensina, las células comenzaron a responder con pequeños aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$. Las respuestas se hacen más grandes luego de una segunda incubación con monensina durante 4 min. Las células tratadas con monensina muestran tanto aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ como facilitación uso-dependiente de las respuestas. **C:** Registro de los cambios de fluorescencia en una célula espermatógenica cargada con BCECF. La primera parte del registro muestra que el pHi regresa completamente a los valores de reposo luego de aplicaciones sucesivas de NH_4Cl . La segunda parte del registro muestra que luego de la aplicación de monensina, el pHi basal aumenta sin un incremento concomitante en la magnitud del aumento de pHi inducido por la aplicación de NH_4Cl . Véase también que las respuestas al NH_4Cl luego de la monensina también decaen completamente a los niveles previos a la estimulación.

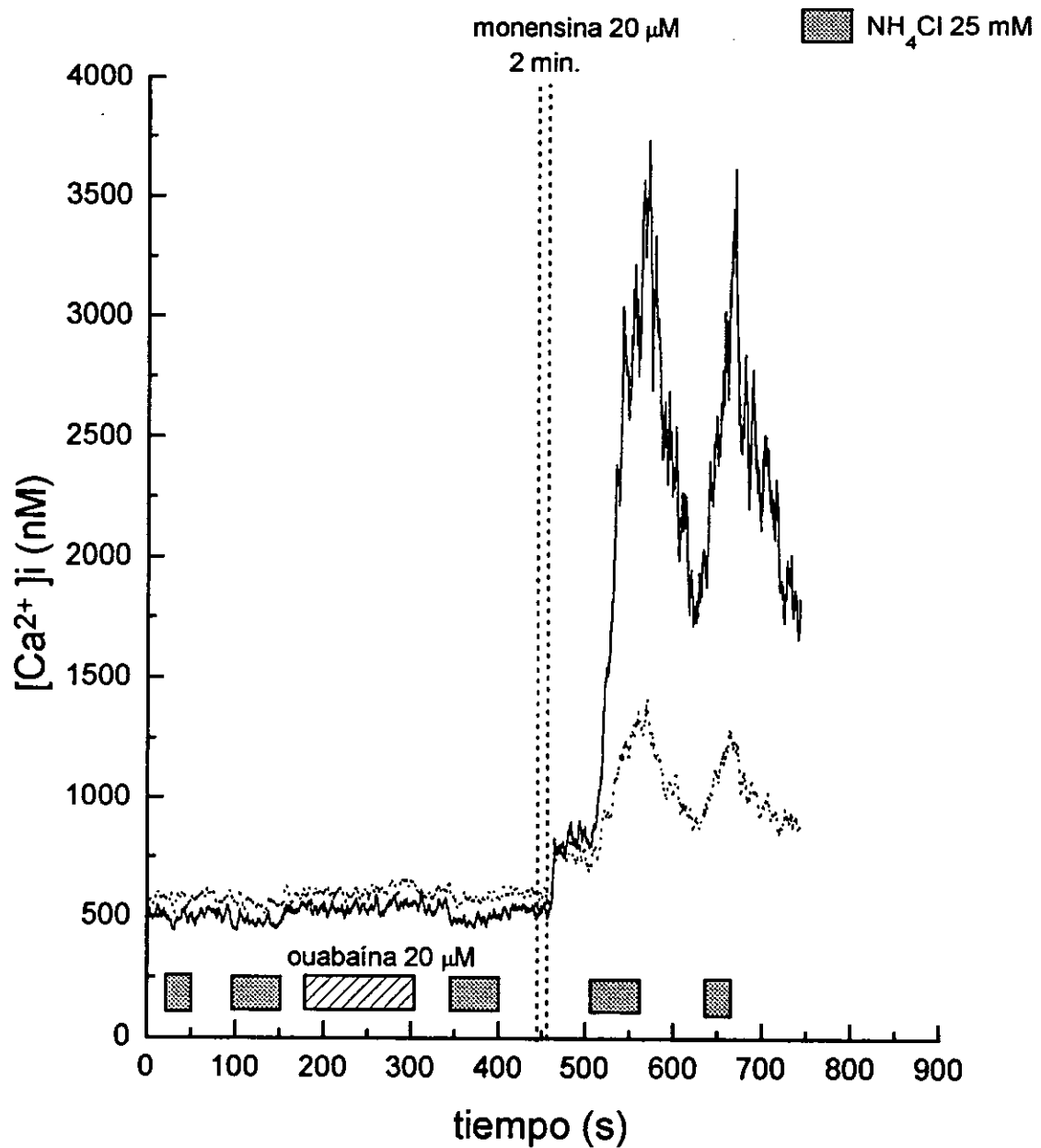


Fig. 29 Efecto de 20 μM ouabaina. Al inhibir la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, la ouabaina debería producir un aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ sin producir cambios concomitantes en el pH_i . La aplicación de 20 μM ouabaina no produce aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante las aplicaciones posteriores de NH_4Cl . Esto indica que el efecto de la monensina sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por NH_4Cl es debido a un aumento del pH_i y no a un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$.

podría ser relevante para el proceso de capacitación del espermatozoide. En cuanto al efecto de monensina sobre el pH_i , ésta produce un aumento notorio del pH_i basal sin aumentar la magnitud del cambio de pH_i resultante de c/u de los pulsos de NH_4Cl . Por otra parte, las respuestas al NH_4Cl en presencia de monensina decaen completamente hasta los niveles previos a la estimulación (ver fig. 28 C).

Como se mostró previamente las células espermatogénicas muestran un fenómeno de facilitación luego de aplicaciones sucesivas de NH_4Cl . Algunas veces este fenómeno está acompañado de un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ basal. De hecho la facilitación se puede ver aún cuando los pulsos de NH_4Cl se aplican en un medio sin Ca^{2+} , previniendo así la entrada de Ca^{2+} . La pregunta que surge inmediatamente es si esta facilitación dependiente del uso es el resultado de un aumento progresivo y sostenido del pH_i basal.

Los experimentos que se muestran en las figs. 30 y 31 se diseñaron para responder a esta pregunta: la fig. 30 A y B muestra los cambios del pH_i obtenidos en espermatoцитos en paquiteno y una espermátide redonda respectivamente, mientras que la fig. 31 muestra los cambios de pH_i en la cabeza y en el cuerpo residual de un espermatozoide testicular. Como puede verse, luego de aplicaciones sucesivas de NH_4Cl , el pH_i retorna completamente a los valores basales de reposo. No hay facilitación en la respuesta de pH . Estos resultados descartan el incremento del pH_i basal como explicación del fenómeno de facilitación. Es más probable que este fenómeno de facilitación en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se deba a un mecanismo regulado por el pH_i , capaz de inducir modificaciones a largo plazo de la vía de permeación, ya sea por vía directa o a través de segundos mensajeros como el AMPc (Garbers, 1989; Trimmer y Vacquier, 1986a; Beltrán, y col., 1996; Arnoult, y col., 1996b).

Origen del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$

El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la alcalinización puede ser el resultado de la contribución de varios mecanismos como: influjo transmembranal de Ca^{2+} , liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares o ambas cosas (fenómeno conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}).

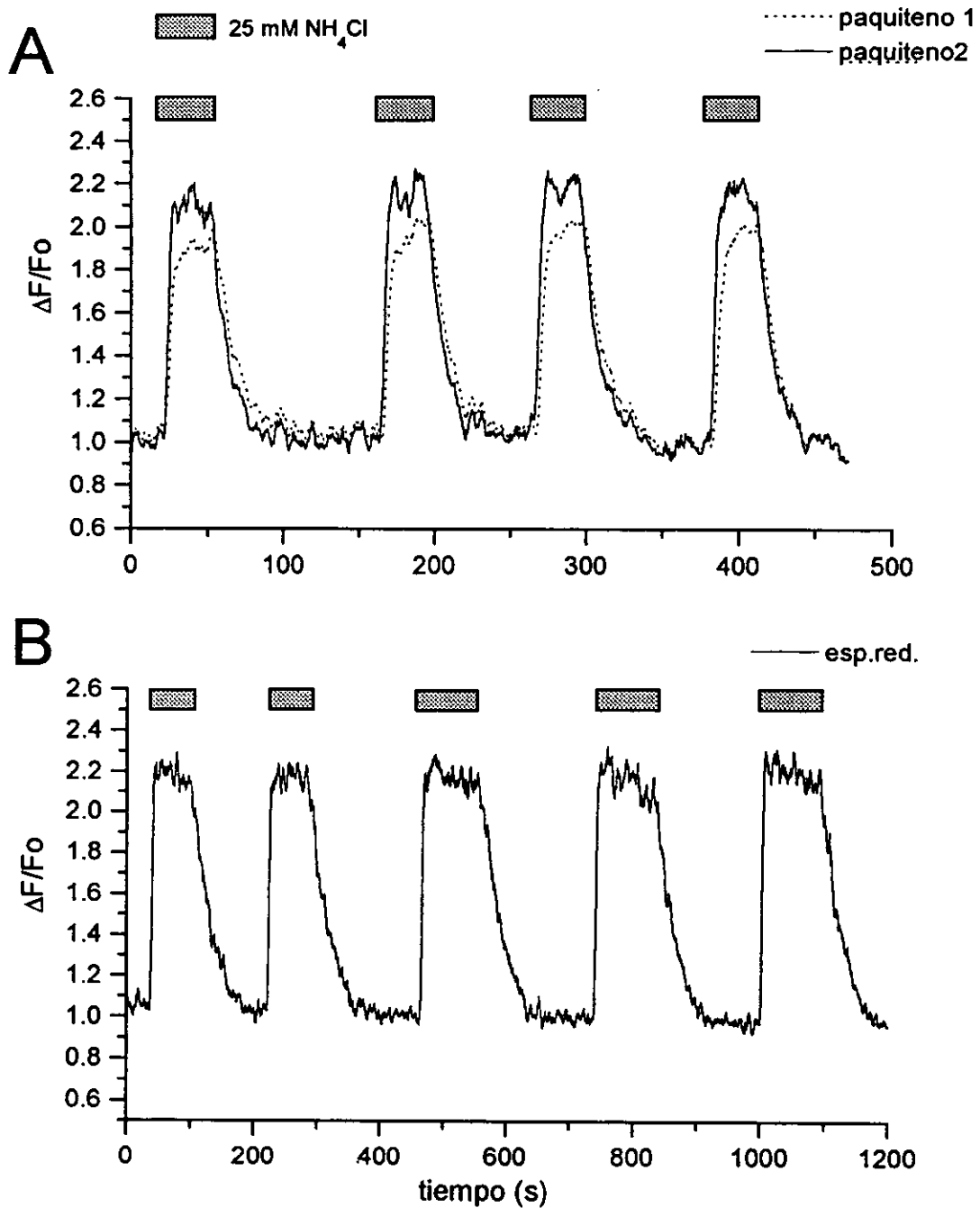


Fig. 30 Cambios de pHi medidos como $\Delta F/F_0$ en dos espermatocitos en paquiteno y una espermátide redonda cargados con BCECF. El aumento de $\Delta F/F_0$ es proporcional al aumento de pHi. El pHi aumenta en cada una de las aplicaciones de NH₄Cl y se mantiene elevado mientras está presente el NH₄Cl. Al terminar la aplicación de NH₄Cl retorna al valor basal previo. No se observa facilitación de los cambios de pHi después de varias aplicaciones sucesivas de NH₄Cl.

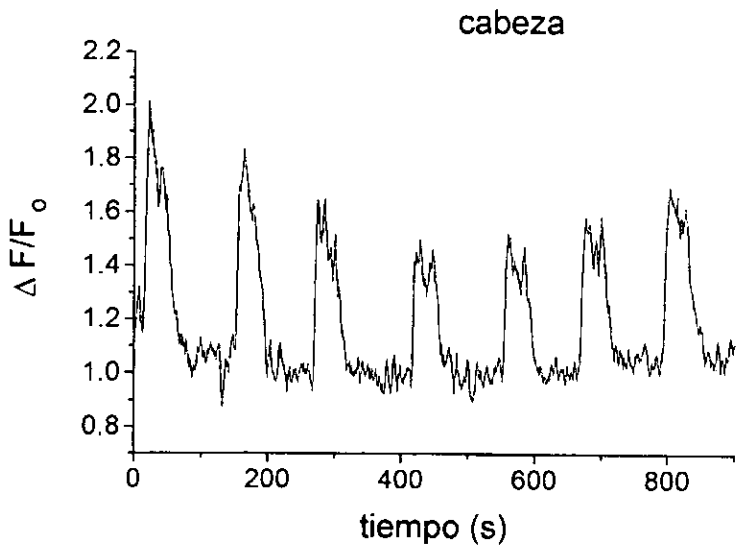
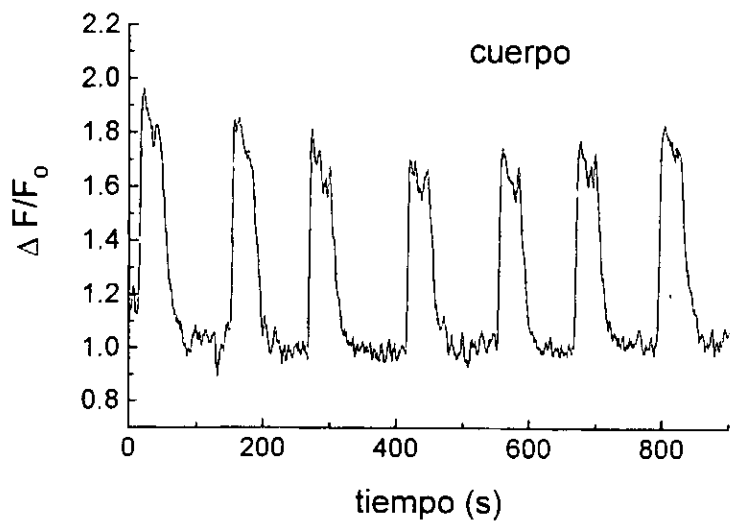


Fig. 31 Cambios de pH_i medidos como $\Delta F/F_0$ del BCECF en el cuerpo residual y en la cabeza de un espermatozoide testicular.

En primer lugar se exploró la contribución de una vía de influjo de Ca^{2+} . Para ello las células se perfundieron con una solución sin Ca^{2+} y con 0.5 M de EGTA (quelante de Ca^{2+}) para eliminar todo el Ca^{2+} contaminante. Se colocaron además dos pipetas de microperfusión en la vecindad de la o las células en estudio controladas por Picospritzers independientes, una con 25 mM NH_4Cl y 2 mM Ca^{2+} y la otra con 25 mM NH_4Cl pero sin Ca^{2+} . Como se puede ver en la fig. 32 A cuando se aplica NH_4Cl en ausencia de Ca^{2+} desaparece el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ haciéndose muy evidente la caída inicial de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cuando el pulso de NH_4Cl se aplica con la pipeta que contiene 2 mM Ca^{2+} , esta fase inicial de caída del Ca^{2+}_i queda enmascarada por el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este caso así como en todos los espermátocitos examinados, es muy claro que se requiere un influjo de Ca^{2+} para que se produzca el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la alcalinización. Este resultado puede obedecer a dos causas posibles: 1) influjo de Ca^{2+} como único responsable del transitorio de Ca^{2+} o 2) el influjo de Ca^{2+} induciendo la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}). La fig. 32 B muestra un experimento similar al anteriormente descrito pero en una espermátide condensante. La diferencia con el anterior es que en este caso, aún en ausencia de Ca^{2+} externo, todavía se puede observar un pequeño aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el pulso de alcalinización. El origen de este aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que persiste en ausencia de Ca^{2+} externo permanece sin ser identificado, si bien lo más probable es que se origine a partir de un reservorio intracelular. Es de destacarse que respuestas como la que se ilustra en la fig. 32 B se vieron sólo en un 10% de las espermátides examinadas.

Para saber cuánto Ca^{2+} hay disponible en los reservorios intracelulares, y si éstos pudieran contribuir en forma significativa en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la alcalinización intracelular, se examinaron los efectos de dos compuestos que tienen efecto farmacológico sobre dichos reservorios: cafeína y rianodina.

La cafeína es un agonista de los canales de liberación de Ca^{2+} conocidos como receptores de rianodina. Esta droga produce liberación de Ca^{2+} de dichos reservorios dando como resultado un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el caso de las células espermátogénicas (en todas las etapas de maduración) la aplicación de 10 mM de cafeína

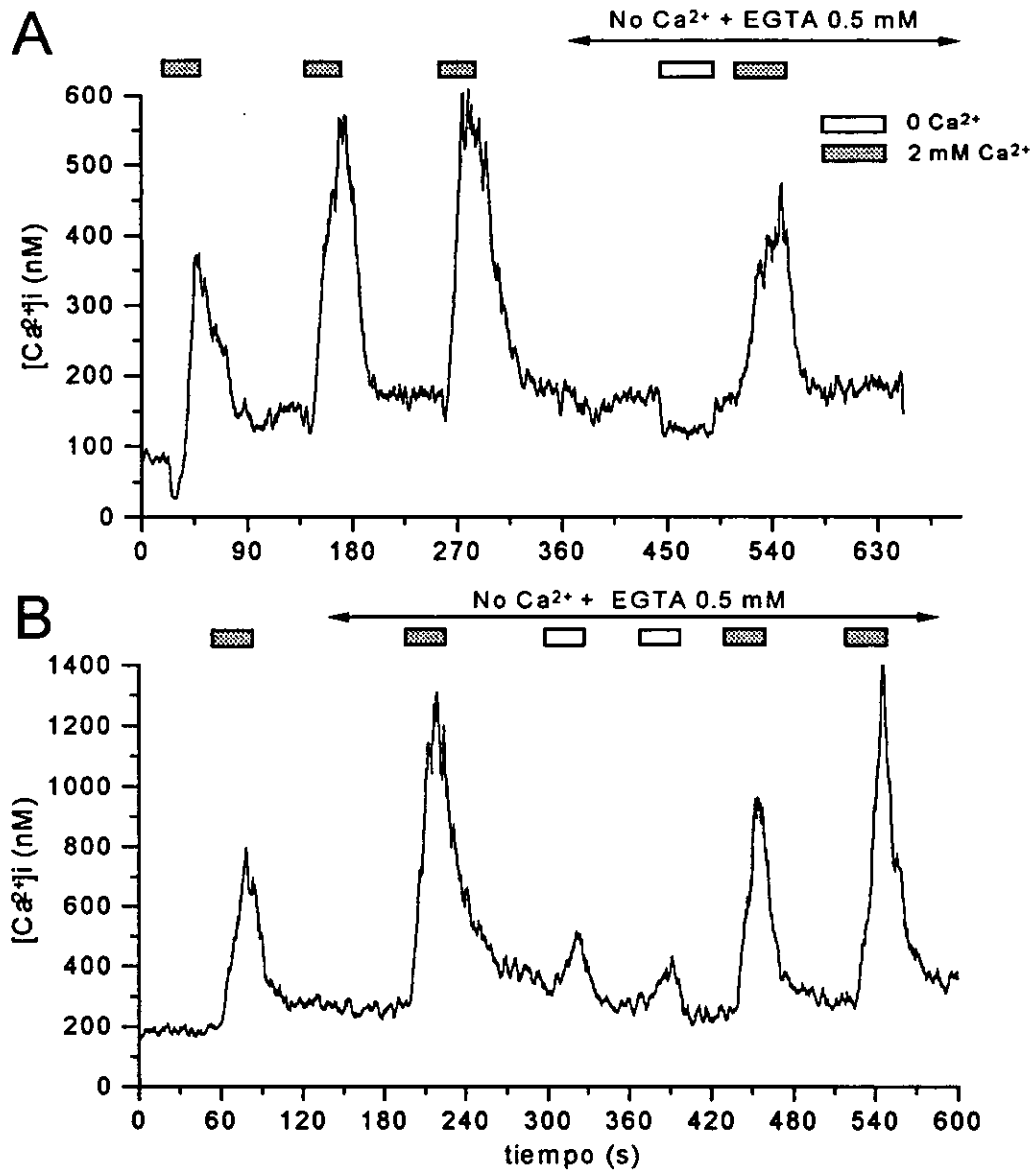


Fig. 32 Contribución del Ca²⁺ externo a los transitorios de Ca²⁺ inducidos por la alcalinización intracelular en células espermatogénicas. Los aumentos de [Ca²⁺]_i se registraron primero en solución normal de control y luego en una solución sin Ca²⁺ y con 0.5 mM de EGTA. Además de la pipeta estándar a través de la cual se aplica el NH₄Cl se coloca una segunda pipeta la cual contiene NH₄Cl sin Ca²⁺ para inducir alcalinizaciones intracelulares en ausencia de Ca²⁺. Las respuestas se obtuvieron de un espermatocito en paquiteno (A), y de una espermátida condensada (B). Cuando el NH₄Cl se aplica en completa ausencia de Ca²⁺ externo, el aumento de Ca²⁺ desaparece (A) o se reduce enormemente (B). Véase que en el panel A, la caída inicial en la Ca²⁺_i que estaba enmascarada por la lenta subida de la [Ca²⁺]_i se hace evidente luego de la remoción del Ca²⁺ extracelular.

no produjo ningún cambio apreciable en la $[Ca^{2+}]_i$. La fig. 33 A muestra un ej. de la aplicación de 10 mM cafeína en una célula espermatogénica.

La rianodina es un alcaloide antagonista de los canales de liberación conocidos como receptores de rianodina. Esta se une preferencialmente al canal abierto, alterando así su mecanismo de compuerta. A bajas concentraciones lo deja atorado en un estado abierto de menor conductancia impidiendo la reapertura del canal. A altas concentraciones la rianodina bloquea en forma irreversible al canal. Como consecuencia de la aplicación de rianodina se producen ya sea aumentos o disminuciones en la $[Ca^{2+}]_i$. En el caso de las células espermatogénicas la aplicación de 5 μ M rianodina no produce ningún cambio significativo en la $[Ca^{2+}]_i$, como se puede ver en el ej de la fig. 33 B.

También se examinaron los efectos de tapsigargina (sequiterpene lactona, derivado de la planta *Thapsia garganica*) y ácido ciclopiazónico (CPA), los cuales son inhibidores específicos de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) (10 y 50 μ M respectivamente). Al bloquearse la recaptura de Ca^{2+} por el RE esperamos encontrar un aumento significativo de la $[Ca^{2+}]_i$ cuya magnitud dependerá de la cantidad de Ca^{2+} disponible para ser liberada de dichos reservorios. Como se ve en las fig. 34 A y B la aplicación de estas drogas no producen efectos o en algunas ocasiones tienen un efecto muy modesto. Curiosamente estos inhibidores solamente producen un efecto apreciable en los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células menos avanzadas en el proceso de maduración (espermatoцитos en paquiteno). Cuando la alcalinización intracelular se produce luego de la aplicación de estas drogas (una de las cuales tiene efectos irreversibles, tapsig), se obtienen transitorios de Ca^{2+} normales (ver fig. 34). Como se puede apreciar en la fig. 34 estas drogas producen un efecto aún mayor en las células más inmaduras (en este caso las paquiteno). Aumentos aún mayores en la $[Ca^{2+}]_i$ se observaron al aplicar tapsigargina en espermatogonias provenientes de ratones de una semana de edad (fig. 27).

Por otra parte, para tener una idea de todo el Ca^{2+} liberable de los reservorios intracelulares presentes en las células espermatogénicas del ratón adulto, se utilizó el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina, el cual libera Ca^{2+} del RE. Como se ve en la fig. 35 la aplicación de 1 μ M de ionomicina en ausencia de Ca^{2+} externo, produce solamente pequeños aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en estas células. Para comprobar la eficiencia de la

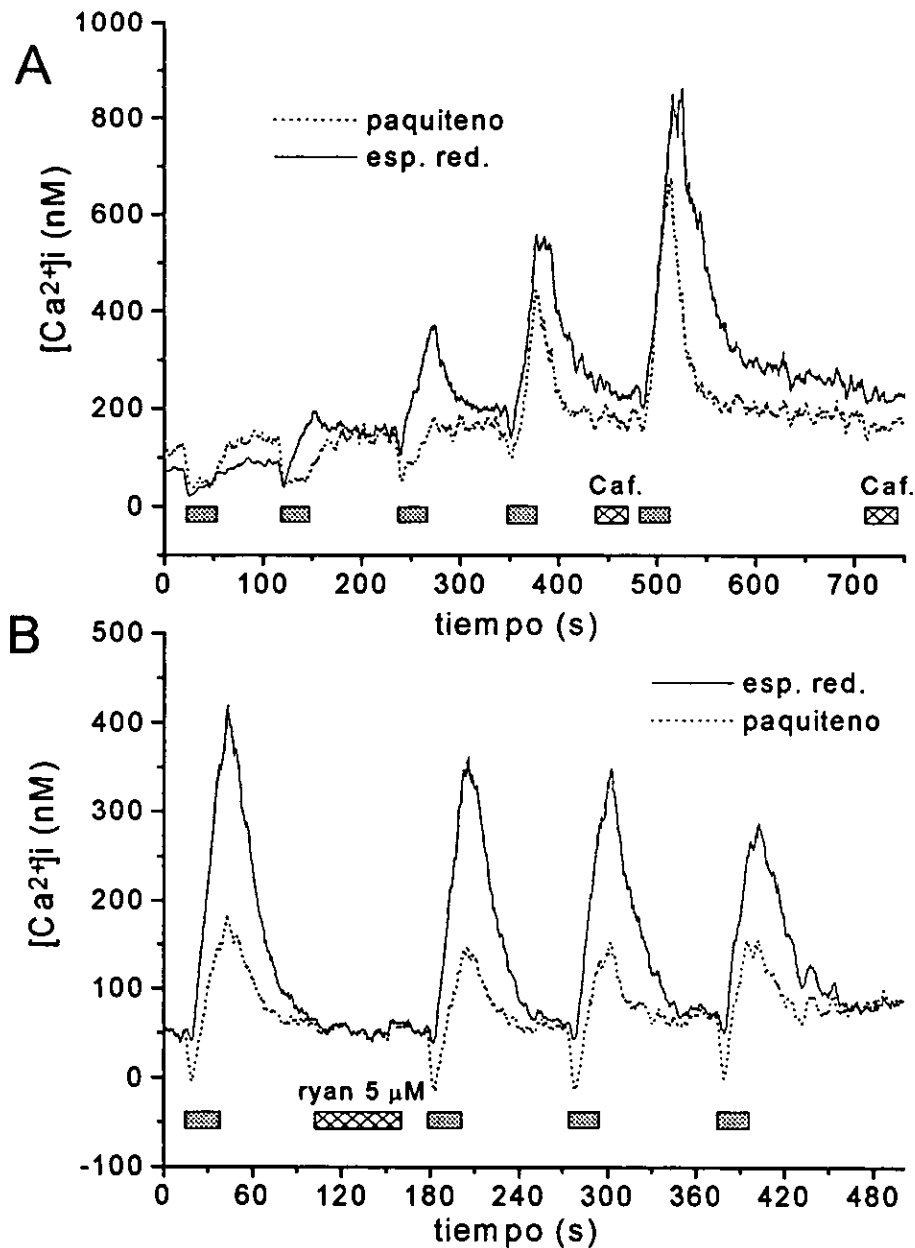


Fig. 33 Efecto de fármacos que afectan la movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares A: Registros de transitorios de Ca^{2+} obtenidos de un espermatocito en paquitenos y una espermátide redonda luego de aplicaciones sucesivas de NH_4Cl (barras llenas). Cuando se aplica cafeína (10 mM) con otra pipeta, ésta no produce aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ ni cambia las respuestas a NH_4Cl de las células espermatogénicas. **B:** en otro par de células puede constatararse que la rianodina (5 μM) tampoco produce aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ en estas células. La disminución de las respuestas al NH_4Cl que se observa en este experimento después de la aplicar rianodina, no se reprodujo en otras células examinadas.

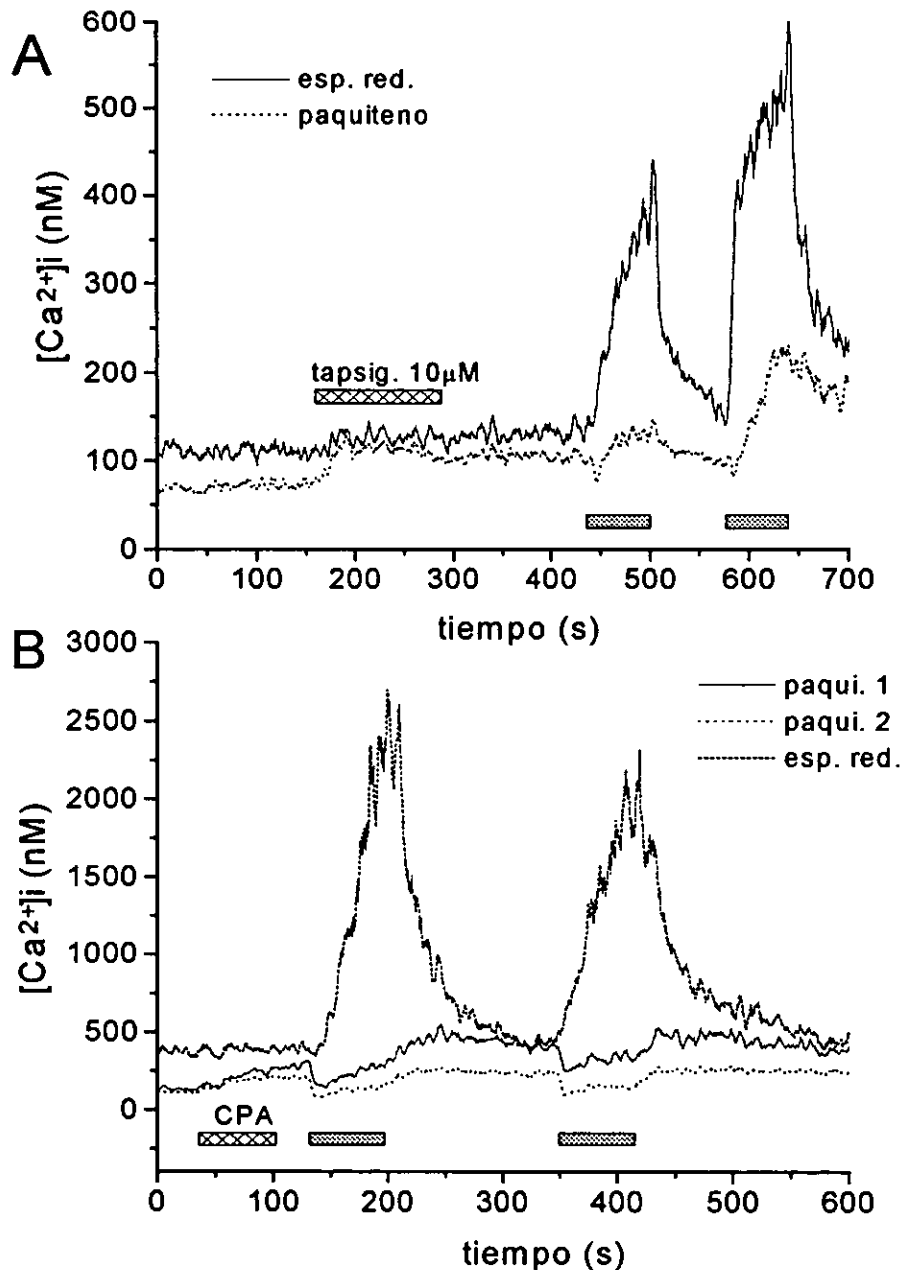


Fig. 34 Efecto de fármacos inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (tapsigargina y ácido ciclopiazónico, (CPA)). **A:** efecto de 10 μ M de tapsigargina en una espermatide redonda y un espermatocito en paquiteno. La fig. A es representativa de 12 células examinadas de la misma forma. Sólo las células menos diferenciadas (en este caso las paquiteno) muestran un discreto aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. **B:** efecto de 50 μ M de CPA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo y sobre las respuestas a la alcalinización de 3 células espermatogénicas. El CPA induce pequeños incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatocitos en paquiteno pero ninguno en la espermatide redonda. Las barras llenas representan las aplicaciones de 25 mM NH_4Cl .

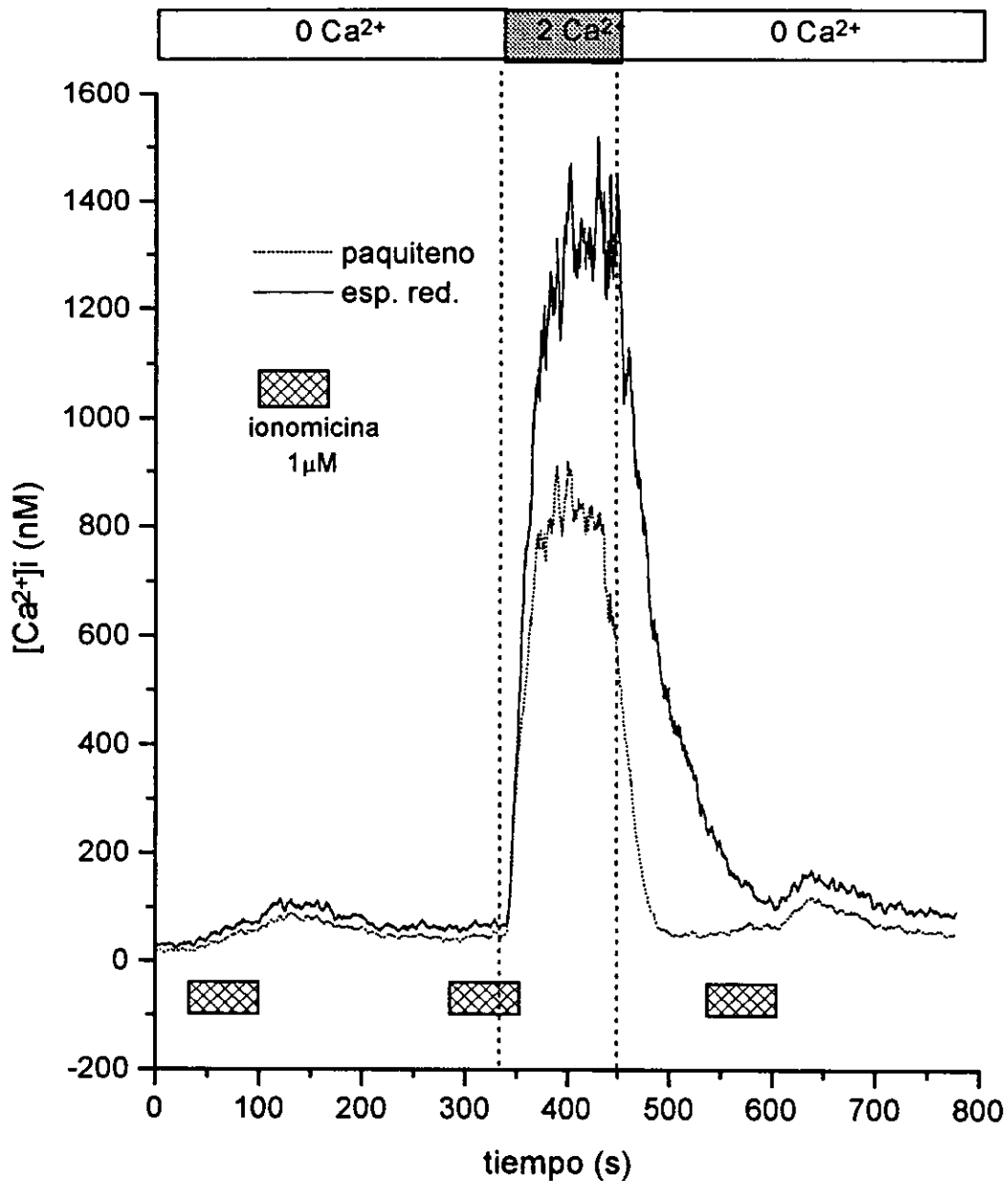


Fig. 35 Efecto de la ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de las células espermatoogénicas. La aplicación de 1 μ M de ionomicina en ausencia de Ca^{2+} externo en dos células espermatoogénicas sólo produce un pequeño incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que sugiere que los reservorios contienen muy poco Ca^{2+} en su interior. Cuando el mismo estímulo se aplica en presencia de Ca^{2+} externo se produce un gran aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento es posiblemente debido a la entrada de Ca^{2+} a través de los poros producidos en la membrana plasmática por la ionomicina. La adición de ionomicina en ausencia de Ca^{2+} externo, luego de esta gran entrada de Ca^{2+} , no logra producir una liberación sustancial de Ca^{2+} .

ionomicina, las mismas células se expusieron al ionóforo en un medio libre de Ca^{2+} y luego se perfundieron con una solución con 2 mM Ca^{2+} . Después de la perfusión se produce un gran aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, probablemente resultante de un influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. La adición de ionomicina inmediatamente después de este llenado de Ca^{2+} no es capaz de producir una gran liberación de Ca^{2+} , sugiriendo que el llenado de los reservorios por Ca^{2+} es despreciable en la escala temporal de este experimento.

Todos estos resultados en conjunto indican que la cantidad de Ca^{2+} disponible para ser liberada de reservorios intracelulares en células espermatoogénicas es muy pequeña como para contribuir significativamente, por sí misma, al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la alcalinización intracelular. Sin embargo, otra posibilidad es que el vaciado de dichos reservorios constituya de por sí una señal importante activando la vía de influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática: canales activados por depleción de reservorios intracelulares (en inglés conocidos como SOCs, store operated channels). Para explorar esta hipótesis se realizó el experimento que se ilustra en la fig. 36. Las células se perfundieron con una solución sin Ca^{2+} y en esas condiciones se les aplicó 10 μM de tapsigargina, que se usa como herramienta para estudiar los SOCs, durante 3 minutos con el fin de vaciar los reservorios intracelulares. Posteriormente con otra pipeta se les aplicó 2 mM Ca^{2+} y en estas condiciones sí se observa un aumento significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La entrada de Ca^{2+} evocada por el uso de tapsigargina sugiere fuertemente la presencia de SOCs en las células espermatoogénicas y dado que los mismos son sensibles al pHi quizás contribuyan al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por aumento del pHi (ver discusión). En ausencia de tapsigargina no se observa un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, al agregar posteriormente el Ca^{2+} .

Permeación a través de la vía de influjo de Ca^{2+} sensible a pHi .

Los experimentos que se describen a continuación se diseñaron para estudiar la selectividad de la vía de permeación de Ca^{2+} regulada por el pHi a distintos cationes divalentes.

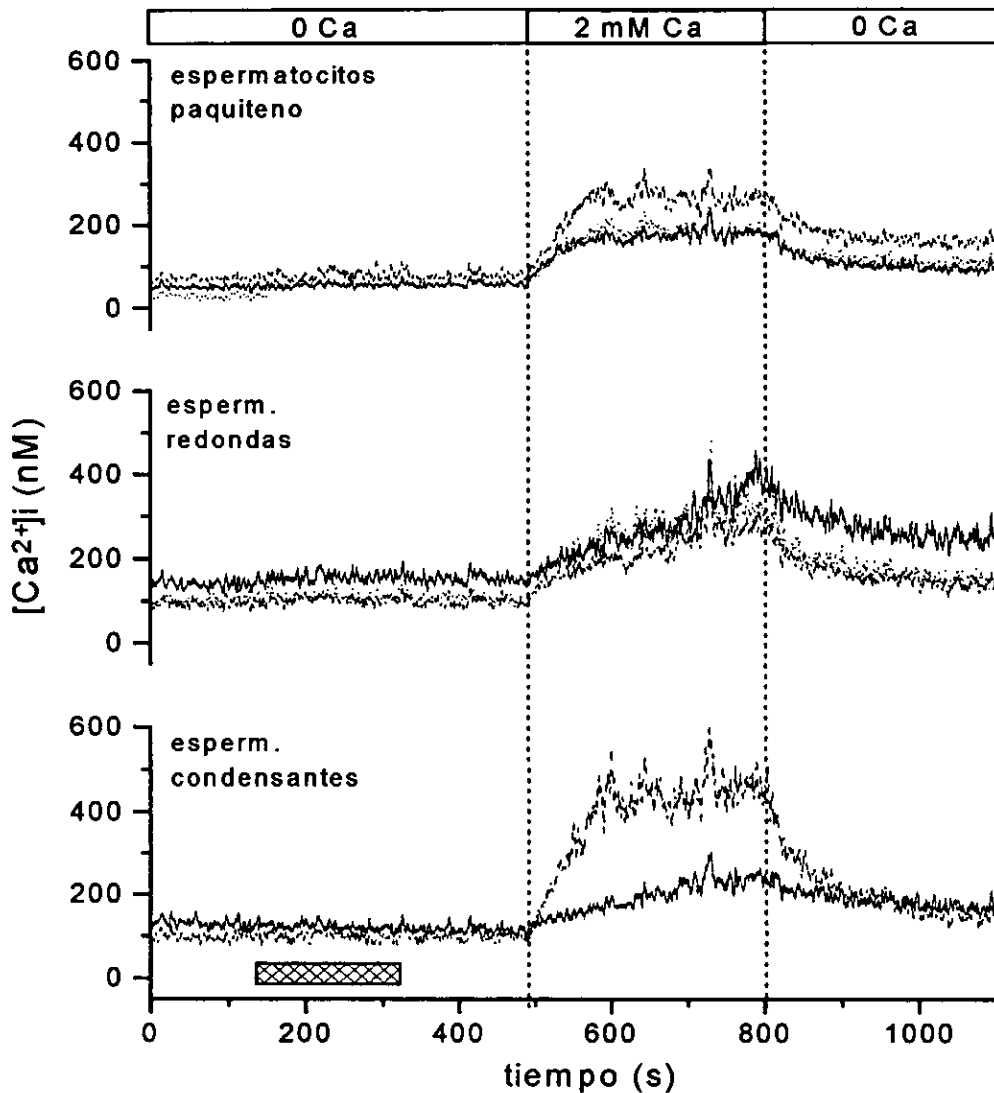


Fig. 36 Evidencia de la presencia de canales activados por el vaciamiento de los reservorios intracelulares en las células espermatoogénicas. La figura muestra un grupo de 8 células espermatoogénicas perfundidas en forma continua con una solución sin Ca^{2+} y en las cuales se aplicó $10 \mu M$ de tapsigargina en el momento indicado por la barra horizontal. La tapsigargina produce a lo sumo un pequeño aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ lo cual sugiere que el contenido de Ca^{2+} de los reservorios es escaso o que el Ca^{2+} es removido de la célula tan rápido como se libera. Cuando las células se perfunden con una pipeta que contiene $2 mM Ca^{2+}$, se observa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ luego de la exposición a Ca^{2+} externo se debe posiblemente al influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática mediado por canales activados por el vaciamiento de los reservorios.

En primer lugar, se exploró si el Ba^{2+} y el Sr^{2+} eran capaces de permear a través de esta vía. Para ello las células se perfundieron en forma continua con una solución libre de Ca^{2+} . A su vez el Ca^{2+} de la pipeta de perfusión se substituyó por distintos cationes divalentes: Ba^{2+} y Sr^{2+} . De esta manera nos aseguramos que durante el pulso de alcalinización las células únicamente se expondrán al catión divalente que se encuentra en la pipeta. Las fig. 37 A y B muestran los resultados obtenidos en dos espermátides redondas. Se graficaron los cocientes de fluorescencia entre 340/380 nm en lugar de las concentraciones intracelulares de estos cationes divalentes, dado que las constantes de disociación del fura-2 para el Ba^{2+} y Sr^{2+} difieren considerablemente en la K_D para el Ca^{2+} . A pesar de que estos experimentos sólo aportan datos semicuantitativos sobre los flujos de divalentes a través de la membrana, sirven para demostrar claramente que tanto Ca^{2+} como Ba^{2+} y Sr^{2+} pueden permear a través de esta vía de influjo activada por la alcalinización intracelular.

Posteriormente se examinó la permeación de Mn^{2+} a través de esta vía (fig. 37 C). Para ello se realizaron otro tipo de experimentos en los que se midió únicamente la fluorescencia a 340 nm. La razón para ello se explica a continuación. El Mn^{2+} al entrar a la célula se une al Fura con alta afinidad produciendo el apagamiento de la señal fluorescente (fenómeno conocido en inglés como quenching). Por lo tanto midiendo la fluorescencia a 340 nm podemos discriminar claramente entre la entrada de Ca^{2+} y la de Mn^{2+} ya que ambas producen cambios de fluorescencia de sentidos opuestos (el influjo de Ca^{2+} produce un aumento de la fluorescencia a 340 nm mientras que el influjo de Mn^{2+} produce una disminución irreversible de la misma). En el experimento que se ilustra en la fig. 37 C las células se perfundieron con solución libre de Ca^{2+} y se expusieron a una solución con NH_4Cl liberado sobre las células mediante una pipeta, primero en ausencia y luego en presencia de 1 mM Mn^{2+} . Como se observa en la fig. 37 C la aplicación de NH_4Cl en ausencia de Mn^{2+} induce la respuesta característica consistente en una caída inicial seguida por una subida más lenta de la $[Ca^{2+}]_i$. En cambio, en presencia de Mn^{2+} la alcalinización produce únicamente una disminución de la fluorescencia. De hecho, cada pulso de NH_4Cl es seguido de una disminución de la fluorescencia de emisión. Este resultado es consistente con la entrada de Mn^{2+} a la célula a través de una vía de permeación

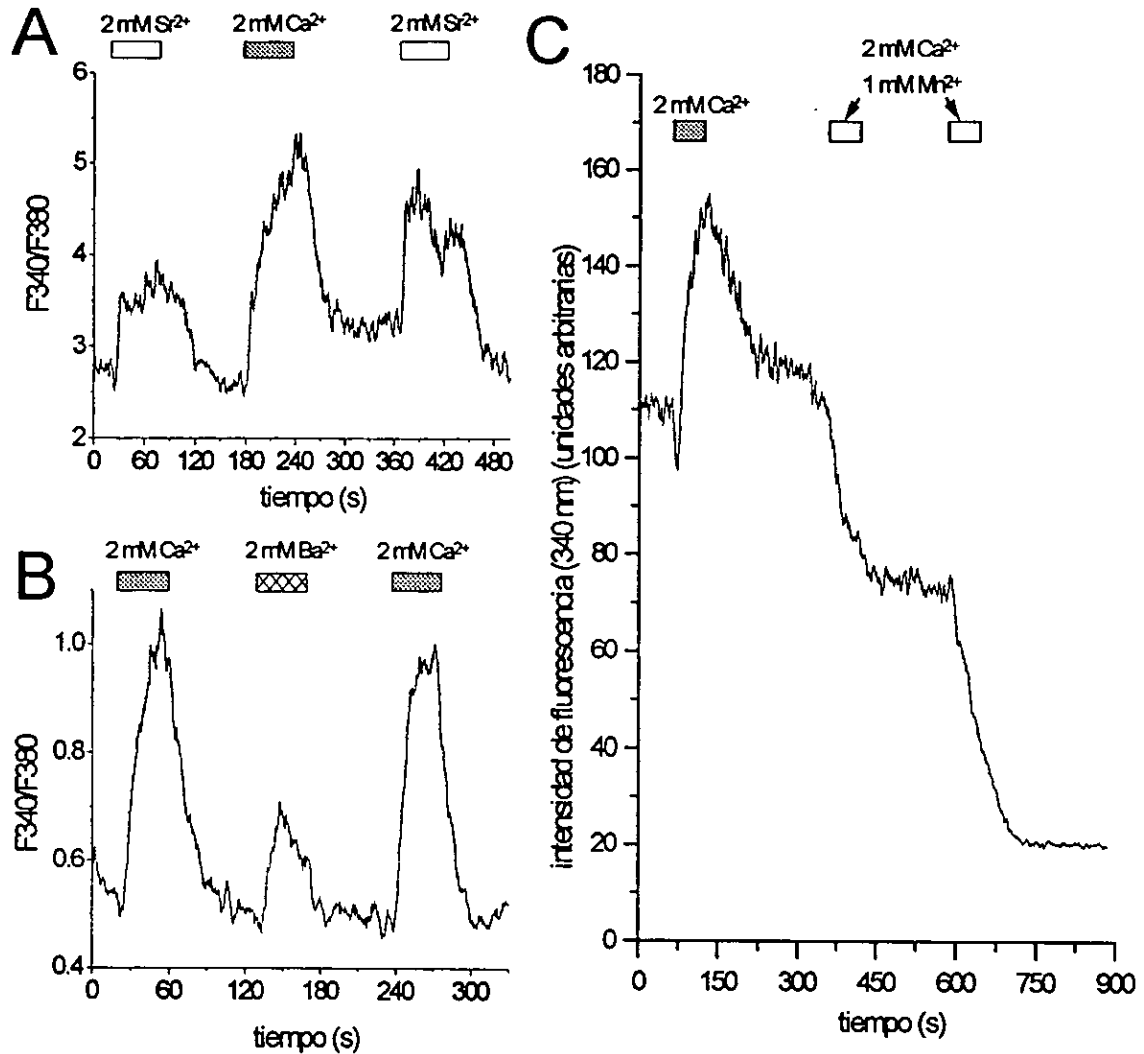


Fig. 37 Selectividad de la vía de permeación inducida por alcalinización intracelular. Los efectos de la sustitución del Ca^{2+} en la solución con NH_4Cl por Ba^{2+} y Sr^{2+} se exploraron en espermátides redondas. Las células se perfundieron con solución sin Ca^{2+} a la cual se le agregó 0.5 mM de EGTA. En la fig. A y B se graficaron solamente los cocientes de las fluorescencias a 340/380 nm. Tanto Sr^{2+} (A) como Ba^{2+} (B) son capaces de permear a través de esta vía inducida por alcalinización intracelular. C: Permeación de Mn^{2+} a través de la vía de influjo de Ca^{2+} inducida por alcalinización intracelular. En estos experimentos se tuvo en cuenta y se graficó únicamente la fluorescencia a 340 nm. La aplicación de NH_4Cl en ausencia de Mn^{2+} (barra llena) induce la característica respuesta de caída en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguida de un aumento de la misma. En cambio, cuando la alcalinización se produce en presencia también de 1 mM Mn^{2+} (barra abierta) se observa una disminución de la fluorescencia.

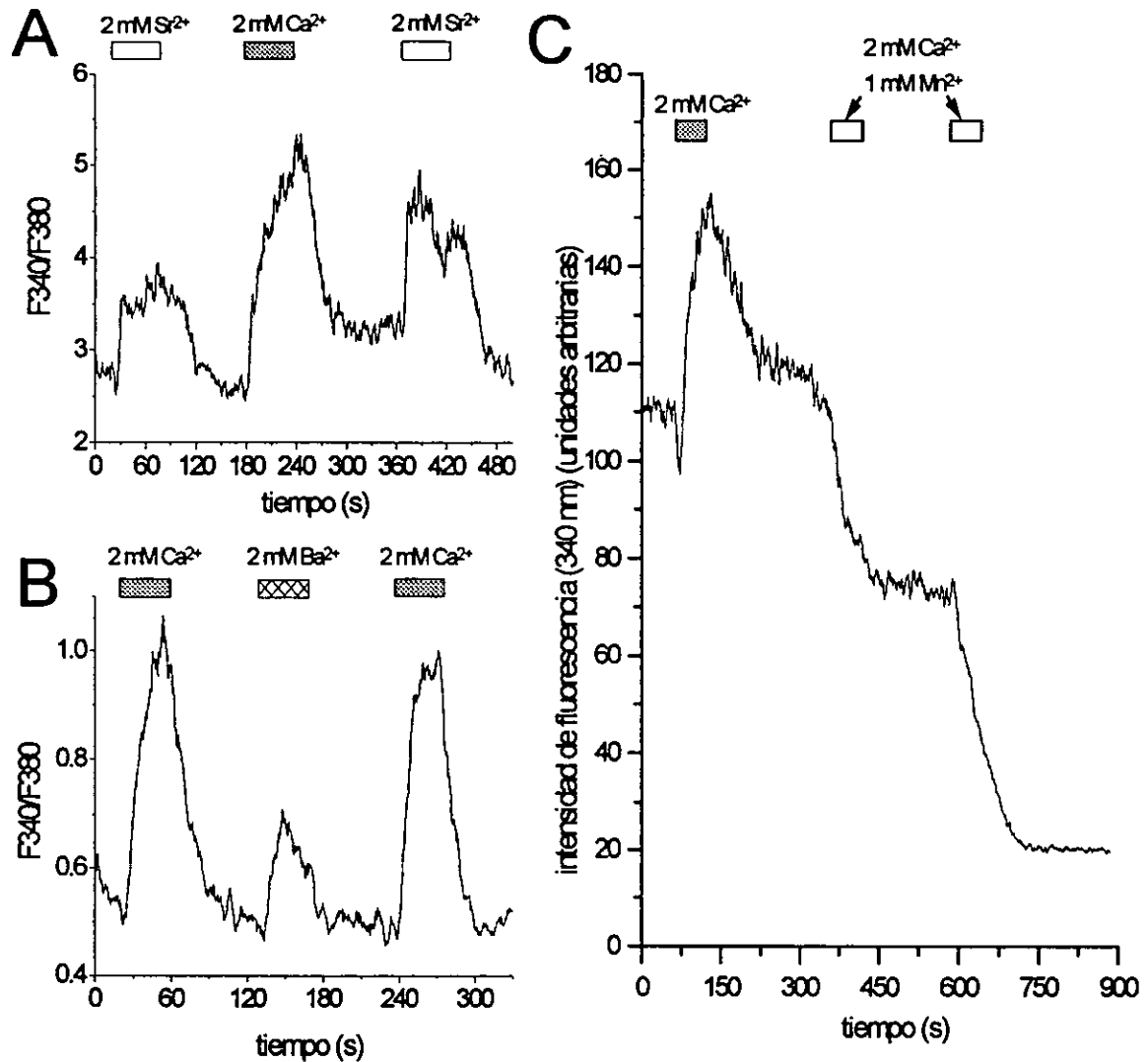


Fig. 37 Selectividad de la vía de permeación inducida por alcalinización intracelular. Los efectos de la sustitución del Ca^{2+} en la solución con NH_4Cl por Ba^{2+} y Sr^{2+} se exploraron en espermátides redondas. Las células se perfundieron con solución sin Ca^{2+} a la cual se le agregó 0.5 mM de EGTA. En la fig. A y B se graficaron solamente los cocientes de las fluorescencias a 340/380 nm. Tanto Sr^{2+} (A) como Ba^{2+} (B) son capaces de permear a través de esta vía inducida por alcalinización intracelular. C: Permeación de Mn^{2+} a través de la vía de influjo de Ca^{2+} inducida por alcalinización intracelular. En estos experimentos se tuvo en cuenta y se graficó únicamente la fluorescencia a 340 nm. La aplicación de NH_4Cl en ausencia de Mn^{2+} (barra llena) induce la característica respuesta de caída en la $[Ca^{2+}]_i$ seguida de un aumento de la misma. En cambio, cuando la alcalinización se produce en presencia también de 1 mM Mn^{2+} (barra abierta) se observa una disminución de la fluorescencia.

controlada por la alcalinización intracelular. Se destaca la ausencia de un incremento de la fluorescencia causado por un influjo de Ca^{2+} en presencia de Mn^{2+} . Una posible interpretación de este fenómeno podría ser que esta vía de influjo regulada por pHi fuera más permeable al Mn^{2+} que al Ca^{2+} . Sin embargo una comparación de selectividad basada en los cambios de fluorescencia no es apropiada dado que el Fura-2 tiene una afinidad por Mn^{2+} 40 veces mayor que por Ca^{2+} (Grynkiewicz col., 1985), y un influjo de Ca^{2+} pequeño se podría subestimar en estas condiciones.

Inhibidores de la vía de influjo de Ca^{2+} activada por alcalinización intracelular.

Como se describirá más adelante, mediante la caracterización biofísica de las corrientes de Ca^{2+} dependientes del voltaje presentes en las células espermatogénicas encontramos que éstas presentan un solo tipo de CCVD de tipo T. Con el fin de explorar la posible contribución de estos canales en el mecanismo de permeación de Ca^{2+} activado por el aumento de pHi, se exploraron los efectos de bloqueadores inorgánicos y orgánicos de los CCVD.

Bloqueadores inorgánicos de CCVD.

Se estudió el efecto de Cd^{2+} y Ni^{2+} (Cd^{2+} 0.5 mM y Ni^{2+} 0.2 mM y 1 mM), encontrándose que los dos inhiben en forma significativa el transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular. En la fig. 38 se muestra el efecto de Cd^{2+} .

El Ni^{2+} (0.2 y 1 mM) es capaz de abolir completamente la fase de aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando ésta es pequeña, pero cuando las respuestas se encuentran potenciadas (luego de pulsos sucesivos de NH_4Cl), una fracción cada vez mayor del transitorio permanece sin bloquearse. Esto se ilustra en la fig. 39 donde se ve el efecto de pulsos o aplicaciones alternadas de NH_4Cl en un espermatocito en paquiteno con y sin 1 mM Ni^{2+} . Este protocolo se diseñó teniendo en cuenta el fenómeno de facilitación de la respuesta. Como se ve en la fig. 39 A los transitorios en presencia de Ni^{2+} son más lentos y de menor magnitud. El efecto del Ni^{2+} en la cinética del transitorio de Ca^{2+} en otro espermatocito en

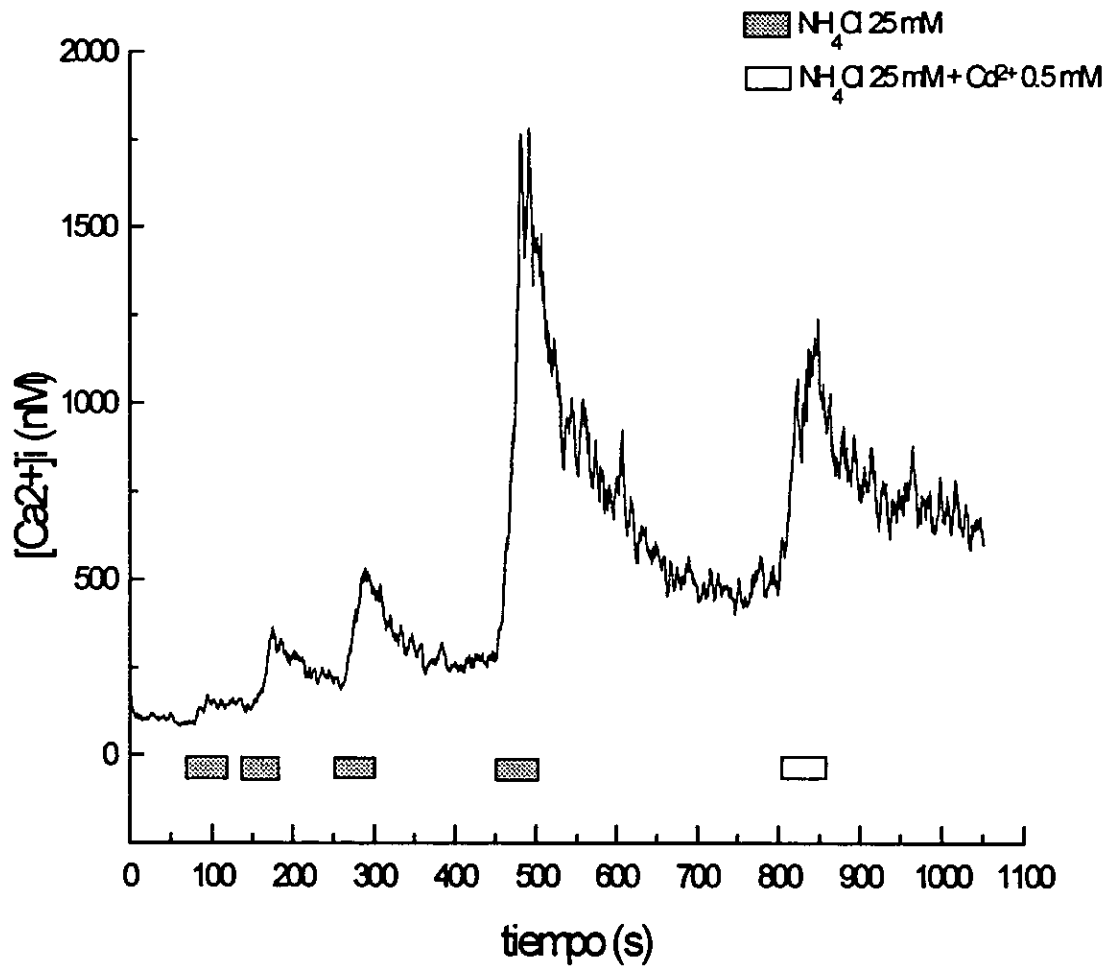


Fig. 38 Bloqueo por Cd^{2+} de la vía de influjo de Ca^{2+} inducida por alcalinización intracelular. Luego de tres pulsos consecutivos de 25 mM NH_4Cl , se aplica un pulso con NH_4Cl y 0.5 mM Cd^{2+} . Se observa una significativa disminución del transitorio de Ca^{2+} en presencia de Cd^{2+} .

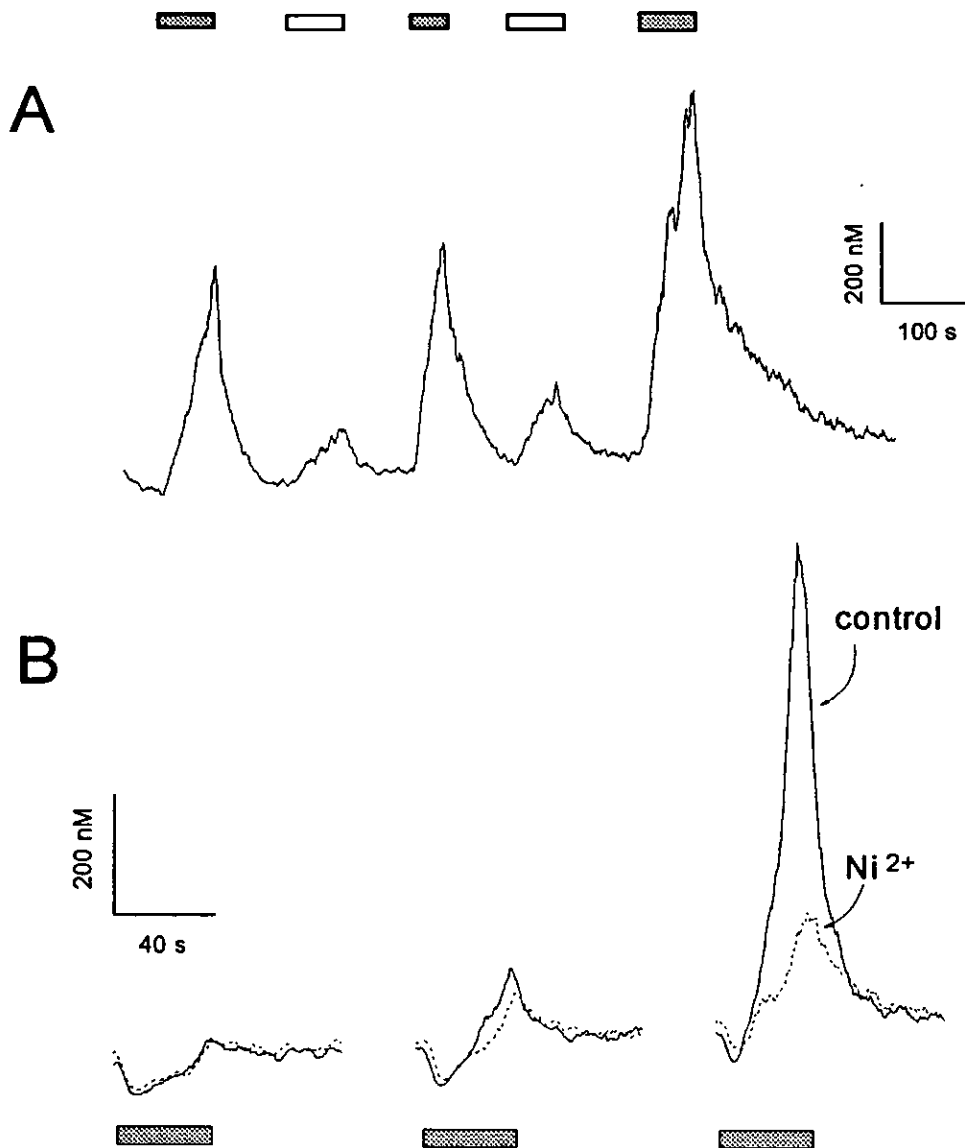


Fig. 39 Bloqueo por Ni²⁺ de la vía de influjo de Ca²⁺ inducida por alcalinización intracelular.
A: Transitorios de Ca²⁺ de un espermatozoido en paquitenio luego de aplicaciones alternadas de NH₄Cl en ausencia (barra llena) y en presencia (barra vacía) de Ni²⁺ (1 mM) (solución externa sin Ca²⁺, solución de ambas pipetas = 2 mM Ca²⁺). Los transitorios de Ca²⁺ inducidos por alcalinización son más pequeños y aumentan más lentamente en presencia de Ni²⁺. **B:** Comparación de las respuestas obtenidas en otro espermatozoido luego de la alcalinización con NH₄Cl alternada (barras llenas) entre la presencia (línea punteada) y ausencia (línea continua) de 1 mM Ni²⁺. El Ni²⁺ inhibe el aumento en la [Ca²⁺]_i sin afectar la caída inicial en la [Ca²⁺]_i.

paquiteno puede apreciarse claramente en la fig. 39 B en la cual los registros en presencia y en ausencia de Ni^{2+} se superpusieron para facilitar la comparación entre los mismos. Luego de la aplicación de $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Ni}^{2+}$, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se inhibió drásticamente, sin verse afectada la cinética ni la magnitud de la caída inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El Ni^{2+} es también capaz de inhibir el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por alcalinización a una concentración de $200 \mu\text{M}$.

Bloqueadores orgánicos de CCVD: nifedipina.

En otro grupo de experimentos se exploraron los efectos de la nifedipina sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por el aumento de pHi . La nifedipina es un bloqueador orgánico selectivo de los CCVD, perteneciente al grupo de las dihidropiridinas (DHP). Si bien la nifedipina es considerada un bloqueador específico de los CCVD de alto umbral tipo L, es también capaz de bloquear las corrientes de Ca^{2+} tipo T ($\text{IC}_{50} = 8.1 \mu\text{M}$) presentes en células espermatogénicas como mostraremos más adelante. La fig. 40 muestra las respuestas de un espermatocito en paquiteno frente a aplicaciones repetidas de NH_4Cl , primero en ausencia y luego en presencia de nifedipina $20 \mu\text{M}$. Ni la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} , ni la facilitación uso-dependiente se vieron afectadas por la nifedipina. Dado que las DHP son muy fotolábiles, su ausencia de efecto podría deberse a su destrucción por la iluminación laser de gran intensidad. Para descartar esta posibilidad, el último pulso de NH_4Cl con nifedipina en la fig. 40 se dio con el laser apagado. Al final del pulso de NH_4Cl se prendió el laser nuevamente. Aún en estas condiciones, se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incluso de mayor magnitud que durante el pulso previo, sugiriendo que la fotólisis de la nifedipina no es la responsable de la ausencia de efecto de la droga. Se realizó otra serie de experimentos en los cuales la Nifedipina $20 \mu\text{M}$ se colocó en la cámara de registro durante más de 10 min. antes del comienzo del registro. Estos permitieron confirmar que la nifedipina no produce efecto sobre esta vía de influjo de Ca^{2+} regulada por alcalinización intracelular. Dado que Florman y col. (1992) reportaron que el efecto inhibitorio de las DHPs sobre la entrada de Ca^{2+} y la RA inducida por la ZP, se produce siempre y cuando las DHPs se incuben en un medio ácido ($\text{pH}=6.5$), realizamos

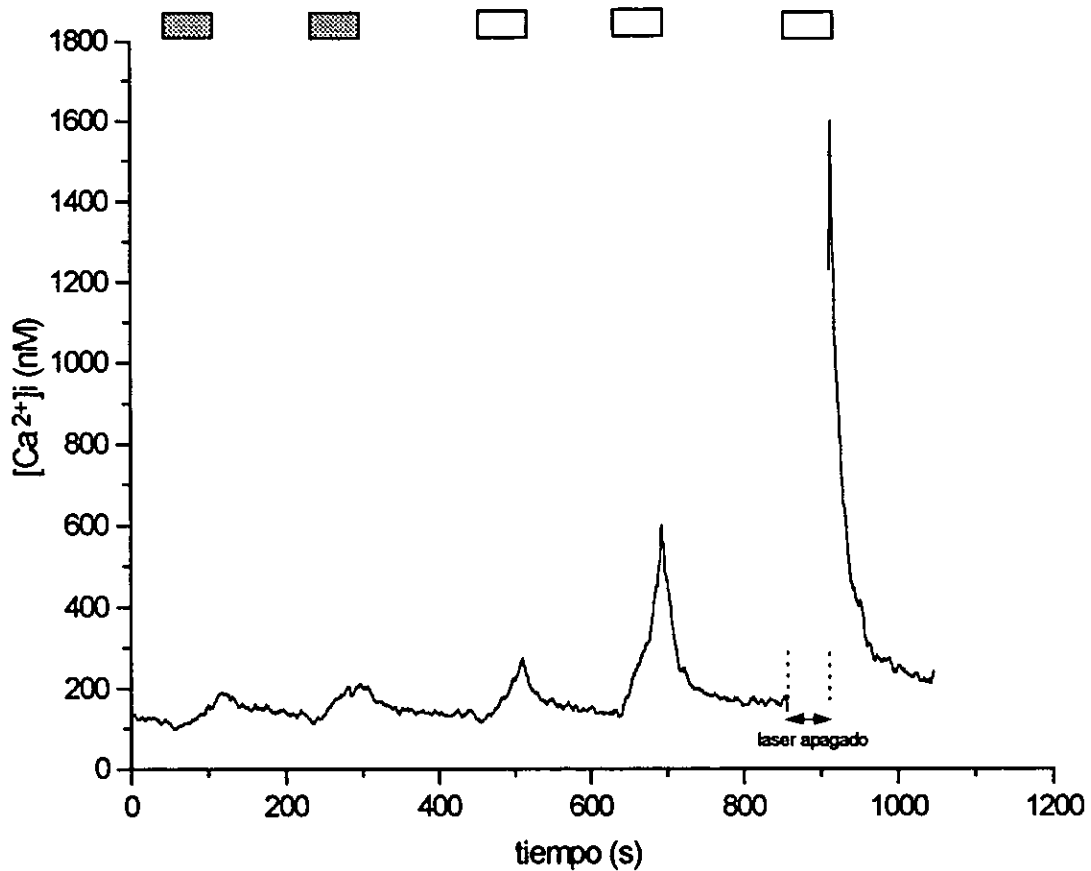


Fig. 40 Efecto de la nifedipina sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización intracelular. Los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización intracelular no son inhibidos por nifedipina. Respuestas obtenidas de un espermatozoido en paquiteno después de aplicaciones sucesivas de NH_4Cl , primero en ausencia (barras llenas) y posteriormente en presencia de $20 \mu\text{M}$ de nifedipina (barras vacías) en la solución de la pipeta. La última aplicación de NH_4Cl y nifedipina se hizo con el laser apagado para prevenir así la posible destrucción de la droga por la iluminación laser.

experimentos a este pH extracelular. En estas condiciones la nifedipina tampoco inhibió el transitorio de Ca^{2+} inducido por la alcalinización intracelular.

De acuerdo a estos resultados farmacológicos no es posible llegar a una conclusión acerca de la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T en esta vía dado que un bloqueador efectivo de estas corrientes como el Ni^{2+} , bloquea también esta vía de permeación mientras que otro bloqueador de las corrientes T como es la nifedipina (ver más adelante), no tiene efecto sobre el influjo de Ca^{2+} disparado por la alcalinización.

Otros posibles bloqueadores del transitorio de Ca^{2+}

Otra posibilidad es que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ actuando en su modo reverso (sacando Na^+ y metiendo Ca^{2+} a la célula) contribuya en el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por alcalinización. Se sabe que la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se incrementa con la alcalinización intracelular (Doering y Lederer, 1993; Doering y col., 1996; Dipolo, 1996). Desafortunadamente no existen bloqueadores específicos del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los bloqueadores clásicos del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ son el Ni^{2+} , un péptido denominado XIP (Dipolo y Beauge, 1994) y el diclorobenzamil (DCB). El Ni^{2+} no constituye una buena elección dado que, como mostraremos más adelante, inhibe las corriente de Ca^{2+} tipo T de las células espermatozógenicas. Por lo tanto no nos sirve para discriminar entre la contribución del intercambiador y la de los canales T al transitorio de Ca^{2+} . El XIP actúa sólo del lado intracelular por lo tanto hay que introducirlo a la célula. Por lo tanto decidimos probar el DCB el cual permea a través de la membrana. La fig. 41 ilustra los efectos de 10 μM de DCB en una célula espermatozógena. En la parte A de la fig. se graficó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en función del tiempo, observándose una disminución aparente del transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización al aplicar 10 μM DCB durante 120 s. Si ahora tomamos en cuenta lo que sucede con las fluorescencias a 340 y 380 nm al aplicar DCB (parte B de la fig. 41), vemos que el DCB produce un gran aumento en la fluorescencia a 380 nm (el DCB fluoresce *per se* a esta λ), con poco o ningún cambio de la fluorescencia a 340 nm. Esto trae como resultado una disminución del cociente entre las fluorescencias 340/380 nm y se traduce en una disminución aparente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que en

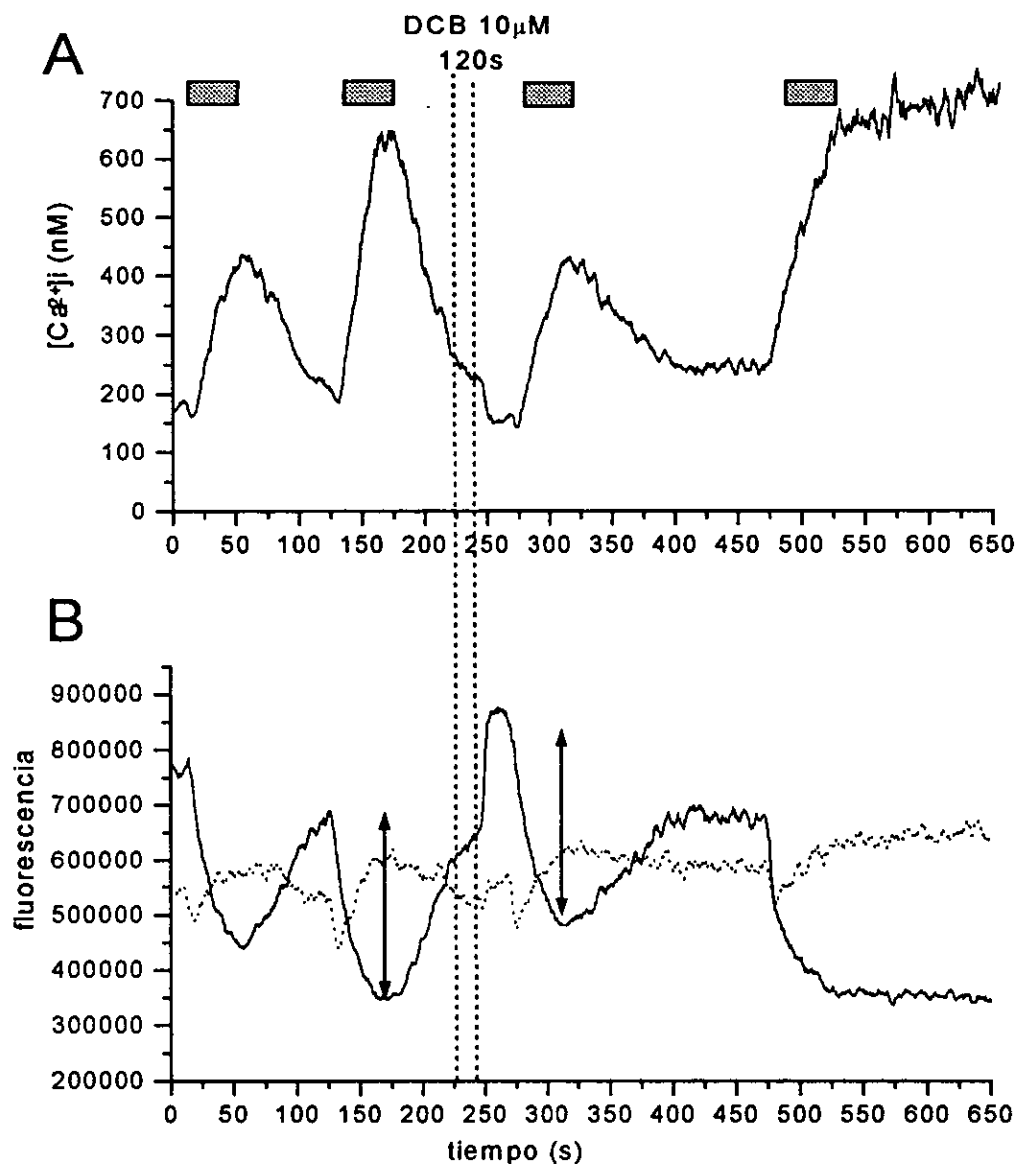


Fig. 41 Efecto del DCB sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización intracelular. A: Transitorios de Ca^{2+} obtenidos al alcalinizar con 25 mM de NH_4Cl antes y después de la aplicación por dos minutos 10 μ M de DCB en el baño. Luego de la aplicación del DCB se observa una disminución aparente del transitorio de Ca^{2+} . Sin embargo observando las fluorescencias a 340 y 380 nm en el panel B de la fig., se puede apreciar claramente un aumento de la fluorescencia a 380 nm causado por la fluorescencia propia del DCB, sin cambio en la fluorescencia a 340. Esto hace que se produzca una disminución en el cociente de las fluorescencias 340/380 nm con la consiguiente aparente disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. La magnitud de los cambios de fluorescencia (indicados por las flechas) a 380 nm producidos por el NH_4Cl son los mismos antes y después del DCB.

realidad es en este caso resultado de este artefacto. Si observamos con cuidado el cambio de fluorescencia a 380 nm (representado por las flechas), encontramos que éste es de la misma magnitud antes y después del DCB. De acuerdo con este resultado, el DCB no es capaz de inhibir el transitorio de Ca^{2+} inducido por aumento del pH_i en células espermatogénicas.

Parte B. Correlato electrofisiológico del influjo transmembranal de Ca^{2+} disparado por alcalinización intracelular.

Dado que en la RA del espermatozoide de mamífero se ha propuesto la participación de uno o varios canales de Ca^{2+} , entre ellos la participación de un CCVD tipo L, nos propusimos estudiar en detalle las corrientes de Ca^{2+} presentes en las células espermatogénicas.

En primer lugar hicimos una caracterización biofísica de las CCVD presentes en estas células, y en segundo lugar, estudiamos la modulación de estas corrientes de Ca^{2+} por el pH_i con el fin de dilucidar si pueden participar o no en el transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular.

Características de las corrientes entrantes presentes en las células espermatogénicas.

En la fig. 42 se observa una familia de corrientes entrantes obtenida de un sinplasto de paquiteno a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, dando pulsos depolarizantes de 120 ms de duración que van desde -70 a +10 mV en pasos de 10 mV. Estas corrientes son transitorias y se activan e inactivan rápidamente. La curva I-V muestra que son corrientes de bajo umbral de activación dado que comienzan a aparecer a un potencial bastante negativo (-60 mV), llegando a un máximo alrededor de -20 mV. No se observa un componente de la corriente que se active a potenciales más depolarizados (componente de alto umbral). Como también puede apreciarse en la fig. 42, el curso

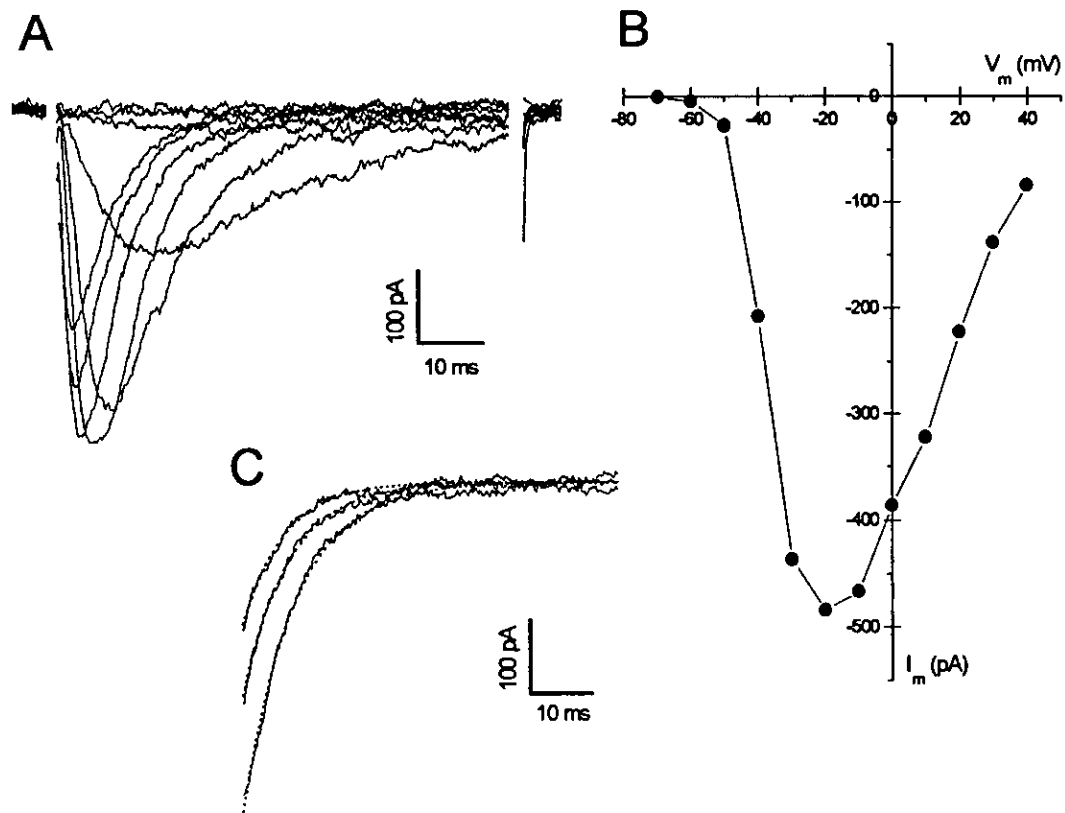


Fig. 42 Relación I-V representativa de las corrientes de Ca^{2+} registradas en espermatoцитos primarios. A: Familia de corrientes de Ca^{2+} producidas por pulsos de potencial desde -70 mV a $+10$ mV en incrementos de 10 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. B: Curva I-V obtenida a partir de los registros en A. La corriente se activa a -60 mV y presenta un máximo a -20 mV. Se destaca la ausencia de un componente de alto umbral en la corriente de Ca^{2+} . C: Los cursos temporales de la inactivación de las corrientes a -20 , -10 , y 0 mV (líneas continuas) se ajustaron a exponenciales simples (líneas punteadas). Las constantes de inactivación obtenidas son de 8.2 , 7.4 y 6.6 ms respectivamente.

temporal de la inactivación a todos los potenciales explorados puede ajustarse a una exponencial simple.

Para examinar la identidad de estas corrientes entrantes disminuimos la $[Ca^{2+}]$ externa de 10 a 2 mM. Esto produce una disminución significativa de la corriente a 1/3 de su amplitud en 10 mM Ca^{2+} . También se observó un desplazamiento de la curva I-V hacia potenciales más hiperpolarizados. Si reemplazamos el Ca^{2+} por Ba^{2+} se observan corrientes de aproximadamente igual magnitud. A su vez si todo el Na^+ externo se reemplaza por colina o se agrega 1.5 μM de TTX a la solución externa el pico de la corriente y la curva I-V no cambian (fig. 43), descartando así la posible contaminación de una corriente entrante de Na^+ . La fig. 44 muestra la curva I-V promedio de 23 células. El umbral de activación de dicha corriente es de -60 mV mientras que el pico de la corriente se encuentra entre -20 y -30 mV. No se observa un componente de la corriente que se active a potenciales más depolarizados, lo cual sugiere que las corrientes presentes en estas células resultan de la activación exclusiva de canales de Ca^{2+} de bajo umbral de activación.

Como se mencionó anteriormente la mayor parte de los registros se obtuvieron de células en paquitenio, tanto células individuales como sinplastos. Excepto por su magnitud las corrientes registradas en células individuales resultan indistinguibles de las registradas en sinplastos. Con el fin de establecer una comparación entre las corrientes registradas en diferentes células se normalizó la magnitud del pico de la corriente de Ca^{2+} por el tamaño de la célula. La densidad de corriente se determinó de la siguiente manera: se midió la capacidad de cada célula registrada promediando 50 pulsos breves de 20 mV de amplitud y realizando la integración digital del transitorio capacitivo. Se asume a su vez que $1 \mu F \cong 1 \text{ cm}^2$ de membrana de tal manera que dividiendo el pico de la corriente entre la capacidad obtenemos la densidad de corriente.

$$C = Q/V$$

$$Q = \int I/dt$$

$$\text{Como: } 1 \mu F \cong 1 \text{ cm}^2$$

$$\text{La densidad de } I = I (\text{pico})/C = \mu A/\text{cm}^2$$

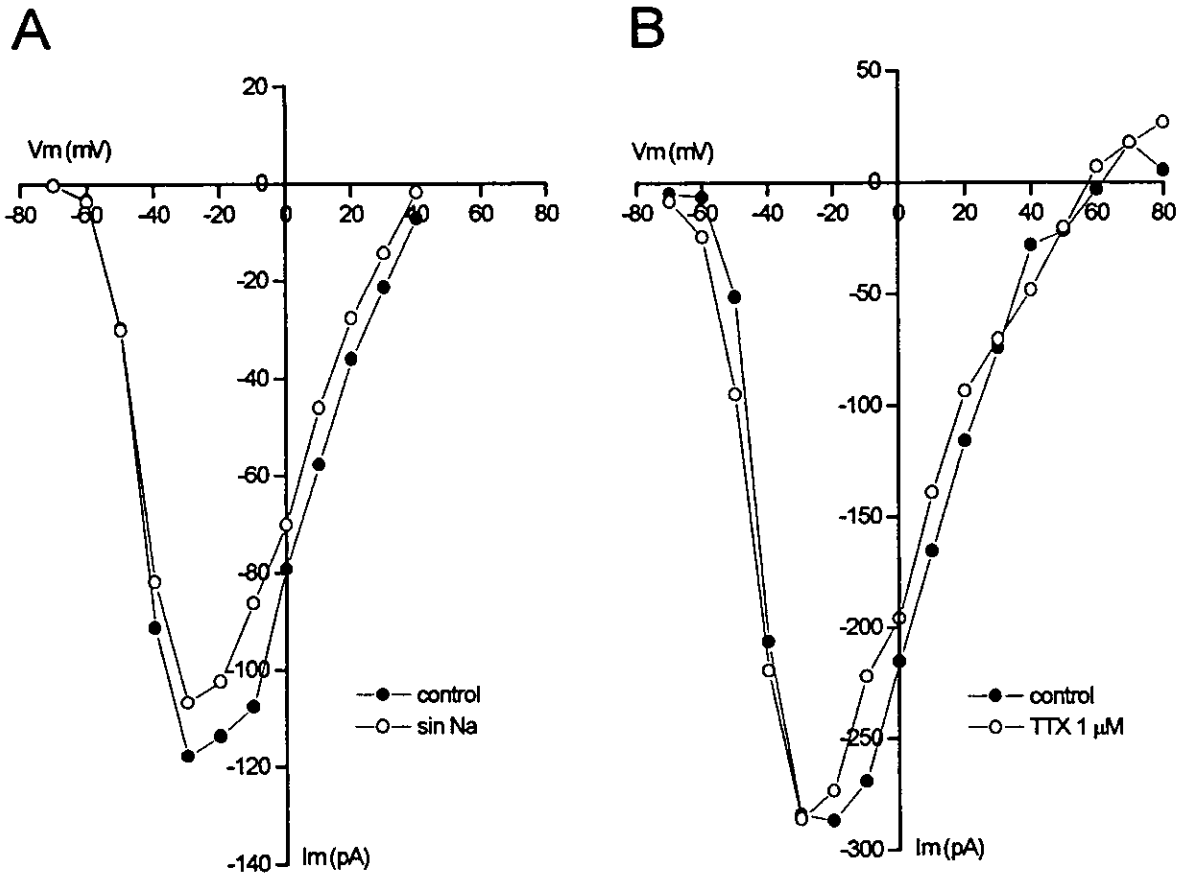


Fig. 43 Curvas I-V obtenidas en condiciones control y al sustituir el Na^+ extracelular equimolarmente por colina (A) o al agregar 1 μM de tetrodotoxina (TTX) a la solución externa (B). Ninguna de estas maniobras produce cambios significativos en las curva I-V.

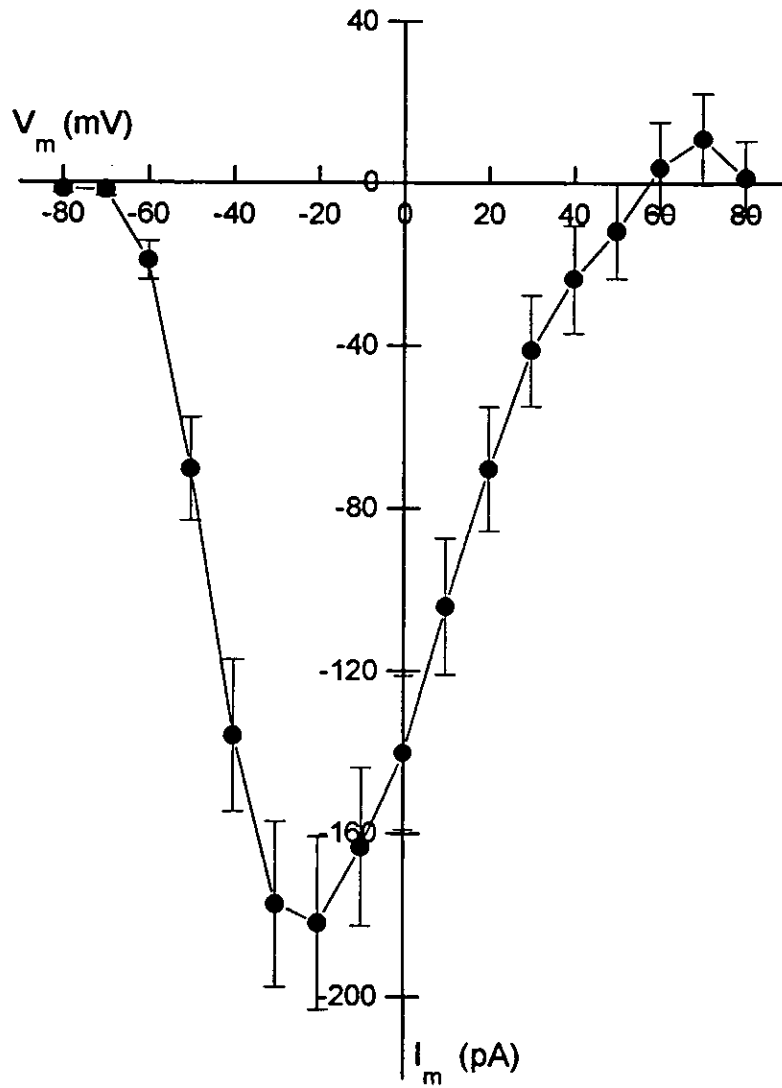


Fig. 44 Curva I-V promedio de 23 células espermatozógenas. La corriente se activa a -60 mV y tiene un máximo a -20 mV. Se destaca la ausencia de un componente de corriente que se active a potenciales más positivos. Las barras representan el DE.

La densidad de corriente promedio de 19 células fue de 6.5 ± 0.6 (DE) $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, en tanto que el rango de capacitancias fue de 16.2 a 52.3 pF con un valor promedio de 33.6 ± 2.3 (DE) pF. El pequeño desvío estándar promedio calculado para toda la población, sugiere que los sinplastos y las células individuales poseen densidades de corriente muy similares. Algunos de los registros se obtuvieron de sinplastos de espermátides. Estas células poseen corrientes con las mismas características que las encontradas en espermatoцитos en paquitenio.

Cinéticas de activación e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} .

Las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatoгénicas alcanzan su máximo en pocos milisegundos y decaen rápidamente siguiendo un curso temporal monoexponencial (ver fig. 42). Con depolarizaciones mayores tanto la activación como la inactivación se hacen más rápidas. Para examinar la dependencia del voltaje de los parámetros cinéticos, se obtuvieron registros a diferentes potenciales y se midieron el tiempo al pico (t_p) y la constante de inactivación (τ_h). La fig. 45 muestra que tanto t_p como τ_h disminuyen con depolarizaciones crecientes: t_p disminuye 45% de 20.6 ± 1.6 ms a -40 mV (media y DE, $n = 16$) a 11.2 ± 1.2 ms a $+10$ mV ($n = 12$), mientras que τ_h disminuye 64% de 20.2 ± 3.1 ms ($n = 12$) a 7.2 ± 0.5 ms ($n = 8$) en el mismo rango de potencial. Por lo tanto tanto t_p como τ_h son voltaje dependientes siendo τ_h el que muestra la mayor voltaje dependencia (un cambio de e veces en la corriente producido por un cambio de 7.47 mV en V_m versus 18.3 mV para t_p). Asimismo ambos parámetros decaen monotónicamente con el potencial hasta alcanzar un valor mínimo independiente del potencial de 10.7 y 7.3 ms respectivamente. Este resultado sugiere la existencia de transiciones independientes del voltaje entre los estados abierto y cerrado y entre los estados activado e inactivado (Chen, y Hess, 1990; Mlinar y col., 1993).

De acuerdo a los esquemas cinéticos clásicos de los canales dependientes de voltaje, el comportamiento cinético de los parámetros de activación e inactivación indica también que estamos en presencia de un único tipo de CCVD.

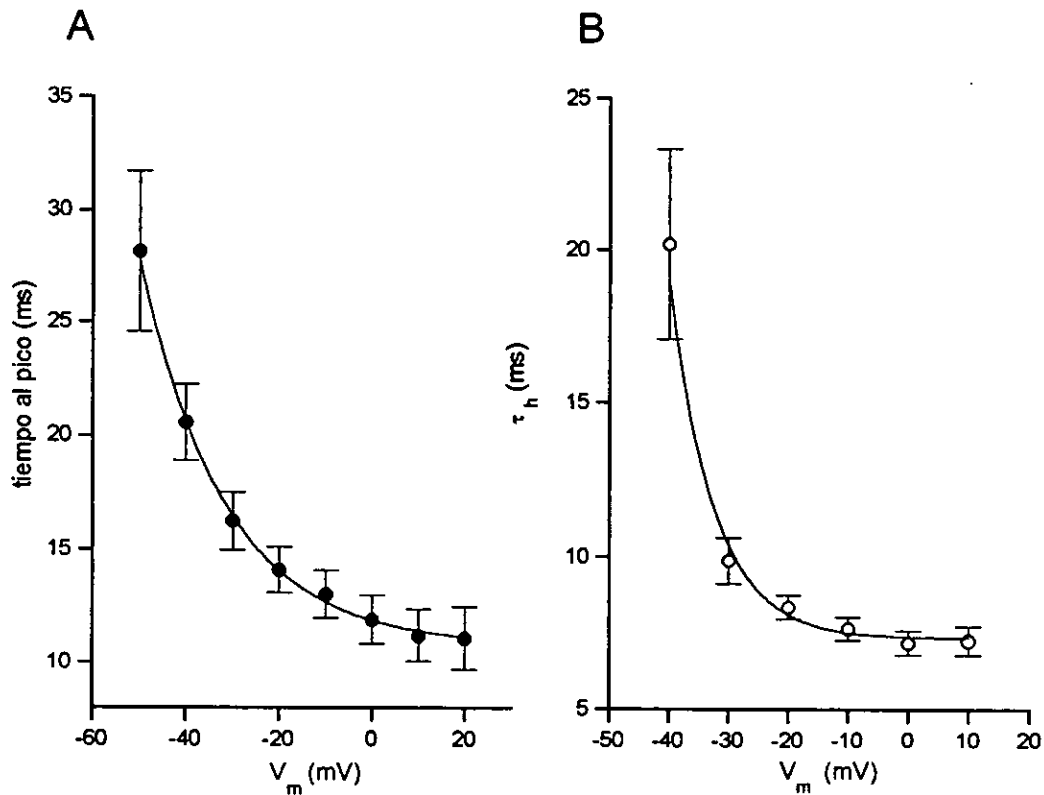


Fig. 45 Dependencia del voltaje de los parámetros cinéticos de activación e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} . A: valores medios de tiempo al pico (t_p) en función del potencial de membrana ($n = 12$). Los datos se ajustaron con una exponencial con un cambio de e veces en la corriente por un cambio de 18.3 mV y con un pedestal independiente del voltaje de 10.7 ms. B: Gráfica de los valores medios de la constante de inactivación (τ_h) obtenidas ajustando las fases de decaimiento de la corriente de Ca^{2+} a exponenciales simples) en función del potencial de membrana ($n=8$). A los valores experimentales se les ajustó una exponencial simple que indica la dependencia del voltaje de τ_h con un cambio de e veces en la corriente por un cambio de 7.47 mV y con un pedestal independiente del voltaje de 7.3 ms. Las barras representan los DE.

Todos los datos obtenidos hasta aquí indican que la corriente de Ca^{2+} presente en la células espermatogénicas corresponde al grupo de corrientes de Ca^{2+} de bajo umbral de activación (low voltage activated calcium channels), que se activan con pequeñas depolarizaciones; transitoria (dado que se inactiva rápidamente), y con una permeabilidad similar para Ca^{2+} y Ba^{2+} . Todas estas características corresponden a las corrientes de Ca^{2+} tipo T, presentes en una gran variedad de células excitables e inexcitables.

Dependencia del voltaje de la activación y la inactivación en estado estacionario.

La fig. 46 muestra un experimento en el cual se realizaron las curvas de activación e inactivación en estado estacionario para una misma célula. La fig. 46 A muestra una familia de corrientes obtenidas con el protocolo que se ilustra en la parte superior de la figura, en el cual a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV se aplican pulsos depolarizantes desde -70 mV hasta -15 mV en pasos de 5 mV. La curva de activación de la corriente de Ca^{2+} se elaboró convirtiendo los valores del pico de la corriente de las curvas I-V en conductancia mediante la ecuación:

$$g_{\text{Ca}} = I_{\text{Ca}} / (V_m - E_{\text{Ca}})$$

donde: I_{Ca} = valor máximo de la corriente de Ca^{2+}

V_m = potencial de membrana

E_{Ca} = potencial de reversión aparente de la corriente de Ca^{2+} obtenido por extrapolación lineal de la parte ascendente de la curva I-V. Los valores de conductancia normalizados, se graficaron posteriormente en función del potencial de membrana (fig. 46 C, círculos negros) y se ajustaron con la ecuación de Boltzmann (fig. 46 C, línea punteada): $g/g_{\text{max}} = \{1 + \exp [-(V - V_{1/2}) / k_s]\}^{-1}$

Donde: g = conductancia

g_{max} = conductancia máxima

$V_{1/2}$ = punto medio de la curva de activación (voltaje al cual se obtiene la mitad de la g_{max}).

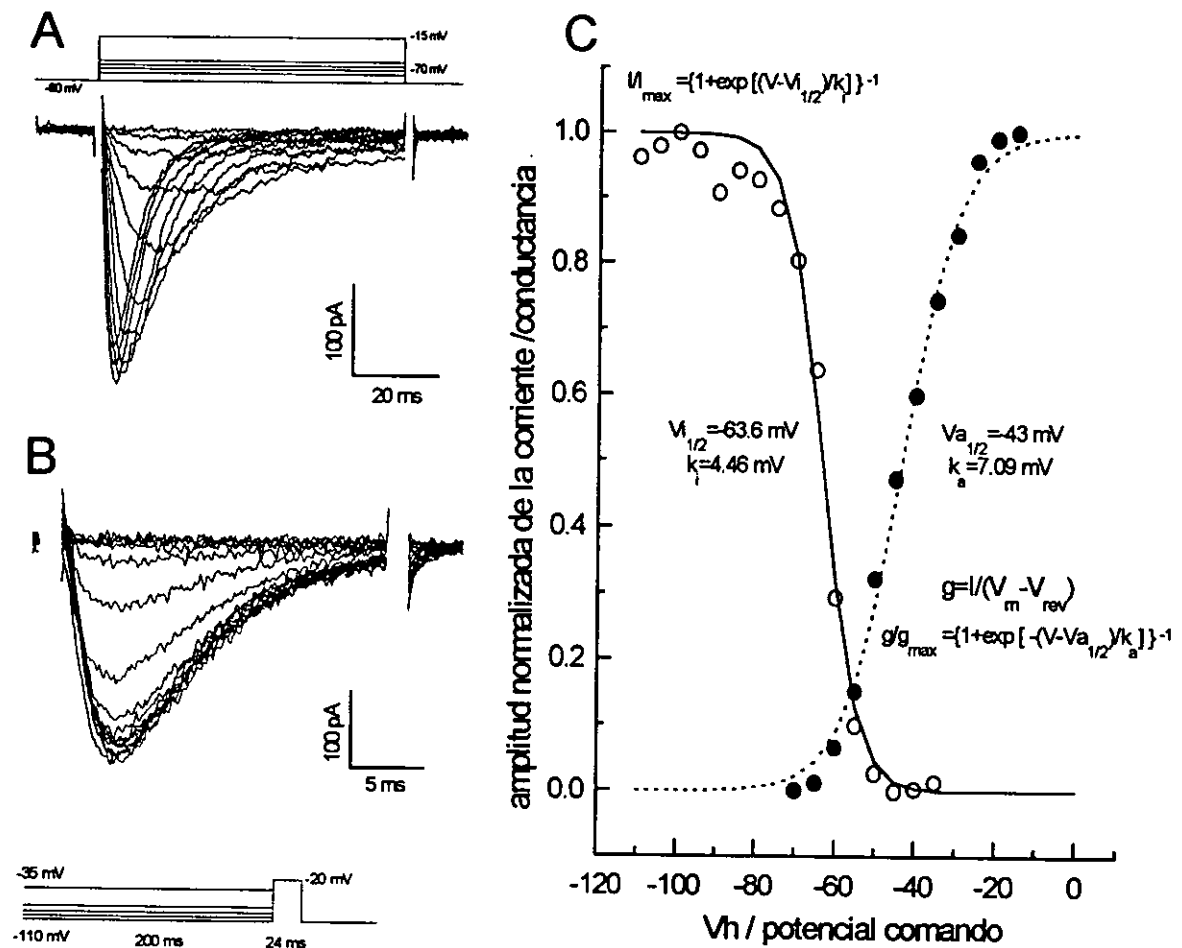


Fig. 46 Dependencias del voltaje de la activación e inactivación en estado estacionario de la corriente de Ca^{2+} en una misma célula espermatozoaria. **A:** familia de corrientes obtenidas con el protocolo de pulsos de activación que se muestra en la parte superior. Estos registros se utilizaron para construir la curva de activación. **B:** registros de las corrientes obtenidas durante el pulso de prueba a -20 mV del protocolo de inactivación que se ilustra en la parte inferior. Estos registros se utilizaron para construir la curva de inactivación. **C:** La curva de activación se obtuvo calculando la conductancia (g) a partir de los registros de **A** y graficándola normalizada en función del potencial comando (círculos llenos). A ésta se le ajustó una ecuación de Boltzman cuyos parámetros se indican en la fig. La curva de inactivación se obtuvo normalizando al pico la amplitud de las corrientes obtenidas durante el pulso de prueba y graficándolas en función del potencial del prepulso (círculos vacíos). A estos puntos se les ajustó una ecuación de Boltzman (línea continua) cuyos parámetros se muestran en la figura.

k_a = factor de pendiente de la curva de activación.

En este ejemplo, la activación se produce entre -65 y -10 mV. El $V_{a1/2}$ es de -43.4 mV y el $k_a = 7.09$ mV. En 9 células examinadas los valores promedio de $V_{a1/2}$ y k_a fueron: -47.3 ± 2.1 y 6.85 ± 0.26 (DE) respectivamente. La fig. 46 B ilustra los registros de corriente utilizados para construir la curva de inactivación en estado estacionario. Estos registros se obtuvieron aplicando un pulso de prueba de 24 ms de duración a -20 mV al final de prepulsos de 200 ms que van desde -100 a -35 mV en pasos de 5 mV. Un intervalo de 10 s se dejó entre los pulsos para evitar la acumulación de la inactivación. La corriente obtenida durante el pulso de prueba se midió y se graficó el pico de la corriente normalizada durante el pulso de prueba en función del potencial del prepulso (fig. 46 C círculos vacíos) y se le ajustó una función de Boltzmann (fig. 46 C línea continua): $I/I_{max} = \{ 1 + \exp [V - V_{i1/2}] / k_i \}^{-1}$

Donde: I = pico de la corriente

I_{max} = pico de la corriente para un prepulso de -110 mV

$V_{i1/2}$ = punto medio de inactivación (valor de potencial al cual se obtiene la mitad de la inactivación máxima.

k_i = factor de pendiente de la curva de inactivación

La inactivación se produce en el rango de potencial que está entre -90 y -40 mV. El potencial medio de inactivación ($V_{i1/2}$) y el factor de pendiente de la inactivación son de -63.9 ± 1.7 (DE) mV y $k_i = 6.4 \pm 0.5$ (DE) mV, respectivamente. Esta curva de inactivación en estado estacionario es muy similar a la obtenida para las corrientes de Ca^{2+} tipo T en otros tipos celulares, tanto en células excitables (Biagi y Enyeart, 1991; Hernández-Cruz y Pape, 1989; Hiriart y Matteson, 1988; Keja y Kits, 1994; Young y col., 1993), como no excitables (Jacob, 1991; Matteson y Armstrong, 1986; Peres y col., 1988). La pequeña corriente de ventana que se observa entre -60 y -50 mV (fig. 46 C) sugiere que en el momento en que estas células se encuentren en este rango de potencial de membrana por un cierto tiempo, se podría producir una corriente entrante de Ca^{2+} sostenida a través de estos canales. Esto determinaría una entrada de Ca^{2+} continua a la célula.

Cinética de deactivación

La relajación de la corriente de Ca^{2+} al cesar el escalón de potencial depolarizante, brinda información acerca del mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos dependientes de voltaje a través de los cuales se produce dicha corriente. Tras el pulso de depolarización, en el instante del inicio de la repolarización, el aumento brusco en el gradiente electroquímico para el Ca^{2+} antes del cierre de los canales da lugar a una cola de corriente. El curso temporal de esta cola de corriente es el resultado del cierre progresivo de los canales que se abrieron durante el pulso de depolarización. La cinética macroscópica de la cola de corriente difiere más de un orden de magnitud para los distintos tipos de canales de Ca^{2+} . Los canales tipo T se caracterizan por tener una constante de deactivación (τ_D) relativamente lenta, (> 1 ms) (Chen, y Hess, 1990; Matteson y Armstrong, 1986).

Las constantes de deactivación de las colas de corriente al repolarizar las células se determinaron mediante un ajuste monoexponencial. En la fig. 47 A se muestran registros de colas de corriente de una célula espermatogénica obtenidos con el protocolo de pulsos que se ilustra en la parte superior de la figura. A partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV se aplicó un pulso prueba a -20 mV de 10 ms de duración y luego se repolarizó el potencial de membrana a diferentes valores de potencial entre -100 y -45 mV. Las colas de corriente así obtenidas se ajustaron a exponenciales simples y se obtuvo así la τ_D para cada valor de potencial. El hecho de que estas colas de corriente tengan un curso temporal monoexponencial a todos los voltajes explorados sugiere fuertemente que estamos en presencia de un sólo tipo de CCVD. La τ_D muestra una fuerte dependencia del potencial, aumentando para potenciales más positivos. En el experimento que se muestra en la fig. 47 A-C la τ_D varía entre 5.8 ms y 0.9 ms en el rango entre -45 y -100 mV. En promedio, la τ_D para 6 células espermatogénicas fue de 7.9 ± 1.3 (DE) ms a -50 mV y se hace más pequeña para potenciales de membrana más negativos alcanzando el valor de 1.2 ± 0.1 (DE) ms a -100 mV, aproximándose a un mínimo de 1 ms independiente del potencial a potenciales más negativos que -95 mV (fig. 47 D). (Chen y Hess, 1990; Mlinar y col., 1993).

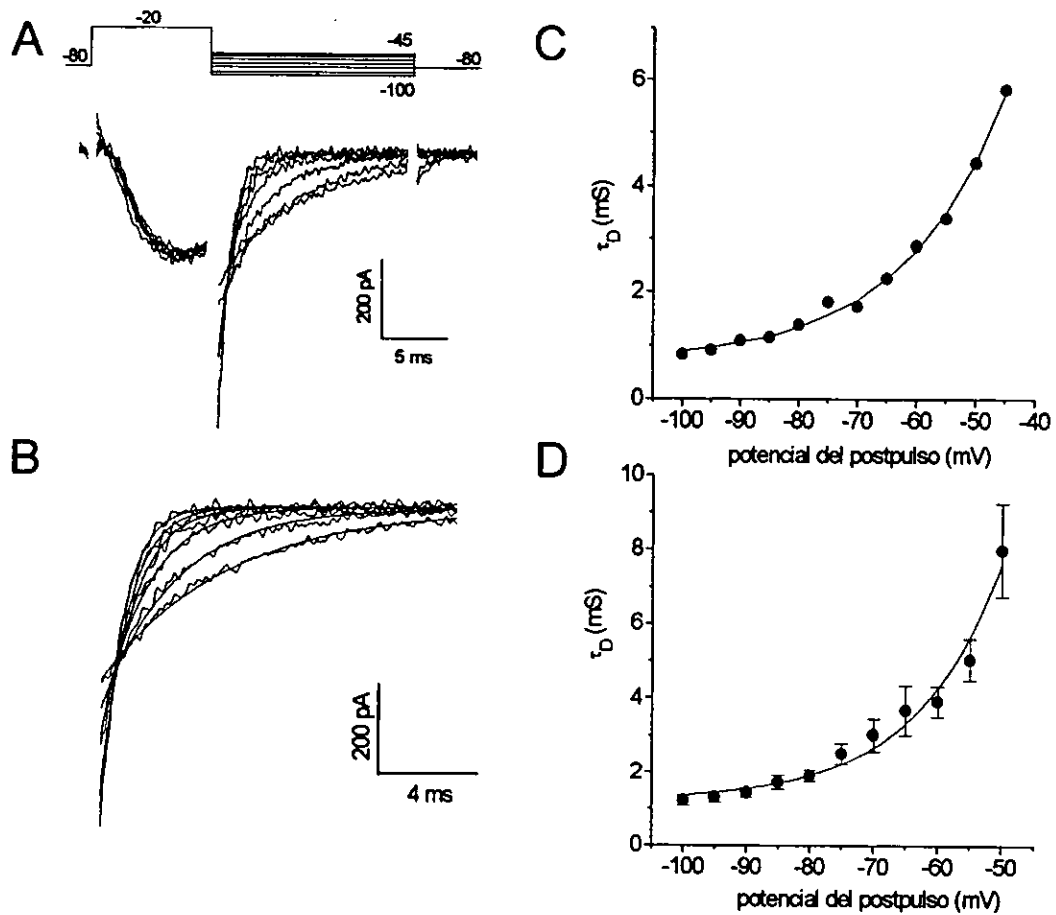


Fig. 47 Dependencia del voltaje de la deactivación de la corriente de Ca^{2+} . A: registros de corrientes obtenidos con el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura diseñados para medir la dependencia del voltaje de la cinética de cierre de los canales de Ca^{2+} . Las constantes de deactivación (τ_D) se determinaron mediante el ajuste monoexponencial de las colas de corriente (B). C: gráfica de τ_D vs el potencial de repolarización para la familia de corrientes obtenidas en A. La línea continua indica la dependencia del voltaje de τ_D con un e fold de 16.9 mV. D: valor promedio de τ_D vs el potencial de repolarización para 6 células espermatozoides. La línea continua indica la dependencia del voltaje exponencial de τ_D con un e fold de 13.6 mV. Las barras representan el DE.

Recuperación de la inactivación

La recuperación de la inactivación se estudió usando el protocolo clásico de doble pulso (a -20 mV). Estos pulsos se aplicaron con un intervalo de tiempo variable entre ellos y a diferentes potenciales de mantenimiento. En la fig. 48 la amplitud del pico de la corriente producida durante el pulso de prueba (segundo del par), se grafica como una fracción de la respuesta producida durante el pulso condicionante en función del intervalo entre los pulsos. Para potenciales de mantenimiento de -110 y -100 mV, el curso temporal de la recuperación pudo ajustarse a exponenciales simples con constantes de tiempo (τ_r) muy similares (131.5 y 117.5 ms respectivamente). A un potencial de mantenimiento de -80 mV, τ_r aumenta considerablemente a 376.5 ms lo que indica la dependencia de τ_r con el potencial aplicado durante el intervalo entre los pulsos. Es obvio que la recuperación de la inactivación para intervalos entre los pulsos de hasta 900 ms de duración, no es completa (85-90% de recuperación). Esto sugiere que la recuperación de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} en células espermatozógenas tiene un componente cinético más lento con una constante de tiempo $>1s$, similar a lo reportado en otros tipos celulares (Hernández-Cruz, y Pape, 1989; Mlinar y col., 1993). Este componente lento es el responsable de $<20\%$ del proceso de recuperación. El curso temporal de la recuperación es similar al observado en fibroblastos 3T3 (Chen y Hess, 1990, Peres y col., 1988). pero significativamente más rápida que la reportada en neuronas (Akaike y col., 1989; Carbone y Lux, 1987; Hernández-Cruz, y Pape, 1989). Esto último puede sugerir diferencias importantes entre canales T de diferentes preparaciones.

Efecto de agentes bloqueadores de los Canales de Ca^{2+}

Desafortunadamente no existen bloqueadores específicos para los canales de Ca^{2+} de tipo T. Los bloqueadores clásicos para dichos canales son el Ni^{2+} y la amilorida aunque ninguno es específico para los canales T.

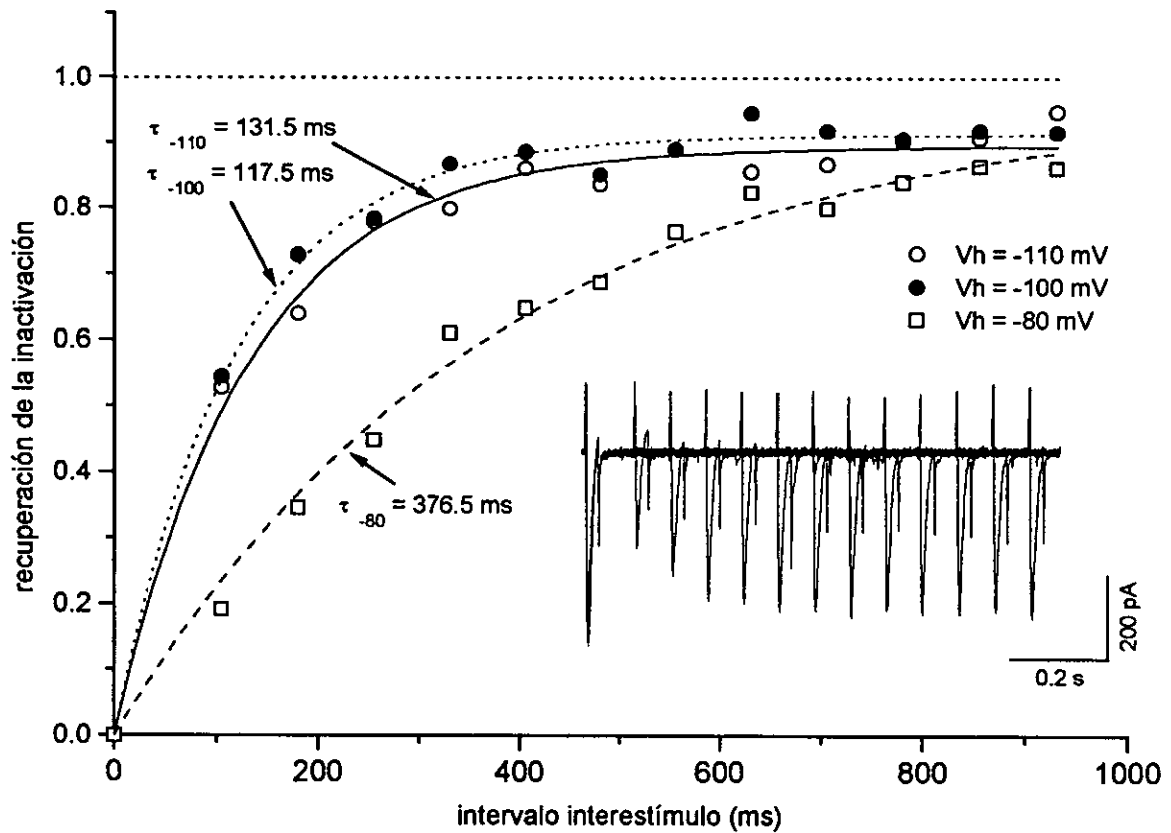


Fig. 48 Dependencia del voltaje de la recuperación de la inactivación de las corrientes de Ca^{2+} . A partir de un potencial de mantenimiento negativo, dos pulsos de voltaje a -20 mV (pulsos condicionante y de prueba), se aplicaron a diferentes intervalos entre estímulos. En el inserto se muestran superpuestos los trazos de ensayos sucesivos en un experimento donde el intervalo entre estímulos se aumentó progresivamente (el potencial de mantenimiento se fijó a -80 mV). En el extremo izquierdo de cada trazo aparece la corriente de Ca^{2+} producida por el pulso condicionante. Se graficó la amplitud de la corriente máxima producida por el pulso de prueba de cada ensayo, como una fracción de la respuesta al pulso condicionante, contra el intervalo entre los pulsos. Se muestran los cursos temporales de recuperación de la inactivación obtenidos a potenciales de mantenimiento de -110 , -100 y -80 mV. Los cursos temporales de recuperación se ajustaron a funciones exponenciales simples, con constantes de tiempo (τ_r) de: 131.5 , 117.5 y 376.5 ms, respectivamente.

La aplicación de 100 y 200 μM de Ni^{2+} en el baño reduce la amplitud pico de la corriente de Ca^{2+} en $39.9\% \pm 2.4$ ($n=4$) y $75.6 \pm 3.9\%$ ($n=2$), respectivamente. El Ni^{2+} no produce un cambio significativo de la voltaje dependencia de la activación ni de las cinéticas de activación e inactivación. La fig. 49 ilustra la curva I-V de la corriente de Ca^{2+} control y en presencia de 100 μM Ni^{2+} .

Por otro lado, la amilorida, (diurético que retiene K^+) ha sido propuesto como un buen bloqueador de las corrientes de Ca^{2+} de bajo umbral de activación, (Tang, 1988), aunque tampoco es específica para las mismas. La fig. 50 muestra el efecto de la perfusión de las células espermatoogénicas con 500 μM de amilorida. La parte A de la fig. muestra la rápida (< 10 s) inhibición del pico de la corriente de Ca^{2+} luego de la aplicación de amilorida, así como la recuperación más lenta y parcial luego de la remoción de la droga. En la fig. 50 B se muestran trazos representativos de la corriente de Ca^{2+} producidos durante un pulso depolarizante de -20 mV obtenidos antes, durante y después de la aplicación de amilorida (trazos a-c). La amilorida produjo una inhibición de la amplitud máxima de la corriente de Ca^{2+} de $61.8 \pm 3.2\%$ ($n=5$). El porcentaje de recuperación luego de lavar la droga fue de $67 \pm 4.4\%$. En la parte C de la fig. se ve que la amilorida no afecta la dependencia del voltaje de la corriente ni la cinética de activación e inactivación de la misma.

Efecto de las DHP sobre las CCVD tipo T presentes en células espermatoogénicas.

Se ha reportado que las dihidropiridinas (DHP) inhiben tanto la depolarización como el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la ZP3, y la reacción acrosomal en espermatozoides de mamífero (Babcock y Pfeiffer, 1987; Florman y col., 1992). Con base en estos hallazgos dichos autores propusieron inicialmente que los flujos de Ca^{2+} dependientes del voltaje presentes en estas células eran mediados por canales de Ca^{2+} de tipo "L". Si embargo, como se demuestra en este estudio, los canales de Ca^{2+} tipo L están conspicuamente ausentes en los espermatoocitos primarios. Por ello, a pesar de que las DHP son consideradas bloqueadores muy pobres de los canales de Ca^{2+} tipo T en muchas células estudiadas (Bean, 1989; Hess, 1990), decidimos examinar el efecto de la nifedipina

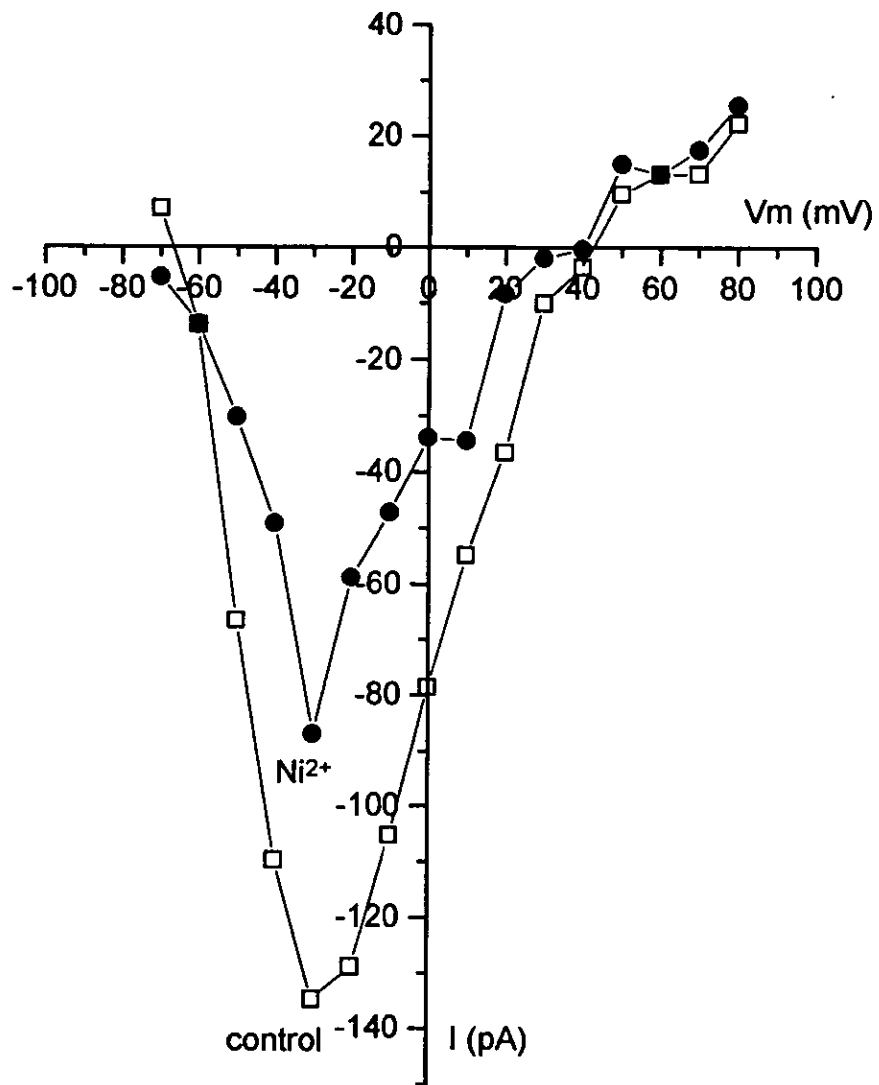


Fig. 49 Efecto de 100 μM Níquel sobre la corriente de Ca^{2+} . Curva I-V control y en presencia de 100 μM Ni^{2+} . El Ni^{2+} produce una disminución de la amplitud máxima de la corriente sin producir un desplazamiento de la curva I-V.

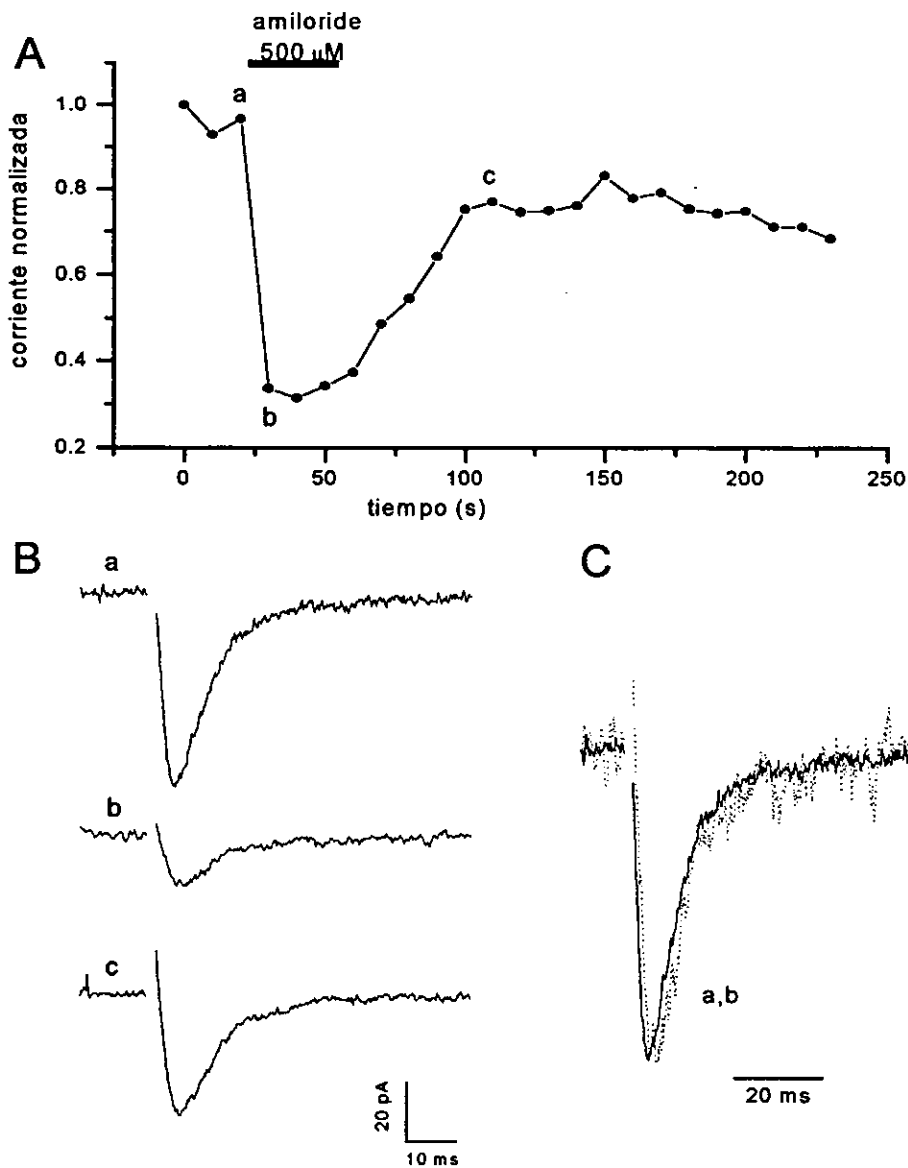


Fig. 50 Efecto de la amilorida sobre las corrientes de Ca^{2+} . Se aplicó 500 μM de amilorida con una pipeta colocada a unas 200 μm de la célula registrada. **A:** gráfica del pico de las corrientes de Ca^{2+} obtenidas con un pulso a -20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV aplicado cada 10 s. La amilorida produce una rápida disminución del pico de la corriente (<10 s) y el efecto es parcialmente reversible al lavar la droga. **B:** trazos representativos de las corrientes producidos por el pulso de prueba correspondientes a los pulsos indicados en la gráfica. **C:** los trazos a y b se normalizaron con respecto a la amplitud pico y se superpusieron para facilitar la comparación de sus cinéticas de activación e inactivación. Nótese que la amilorida no afecta mayoritariamente estas cinéticas.

sobre la corriente de Ca^{2+} de las células espermatogénicas. La fig. 51 muestra las curvas I-V de las corrientes de Ca^{2+} obtenidas antes y después de la aplicación en el baño de 5 y 10 μM de nifedipina. Es claro que la nifedipina inhibe las corrientes de Ca^{2+} en forma dosis dependiente sin afectar su dependencia con el voltaje. El pequeño desplazamiento de aproximadamente 10 mV de la curva I-V hacia potenciales más negativos no se observó en otros 5 experimentos. En promedio 5 μM de nifedipina redujo el pico de la corriente de Ca^{2+} en $38.44\% \pm 8.5\%$ (n=5), mientras que 10 μM de nifedipina la redujo en $53.4 \pm 6.7\%$ (n=3). La fig. 52 A y B muestra la rápida y significativa disminución (aprox. 50%) del pico de la corriente de Ca^{2+} en otra célula espermatogénica luego de un pulso breve de 2 μM de nifedipina aplicado por medio de una pipeta que libera la droga muy cerca de la célula en estudio por medio de presión usando un picospritzer. En la fig. 52 C se superponen los trazos a-c tomados de la B para facilitar la comparación entre los mismos. La nifedipina no afecta las cinéticas de activación e inactivación de la corriente de Ca^{2+} y sus efectos son parcialmente reversibles luego de su lavado. Los datos de la fig. 52 son representativos de otros 4 experimentos en los que se obtuvieron resultados similares.

También se exploró el efecto del BAYK 8644 (DHP agonista de la corriente de Ca^{2+}) a una concentración de 5 μM (n=3), no encontrándose ningún efecto significativo sobre la corriente de Ca^{2+} de las células espermatogénicas.

Efecto de la alcalinización intra y extracelular sobre las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatogénicas.

Dado que los canales T son los únicos CCVD presentes en las células espermatogénicas, de estar también presentes en el espermatozoide maduro, podrían participar en los aumentos de Ca^{2+} intracelular inducidos por ZP3, requeridos para iniciar la reacción acrosomal.

Dado que dichos aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son sostenidos, y la activación de los canales de Ca^{2+} T es transitoria, se han postulado diferentes mecanismos mediante los cuales los canales T podrían ser capaces de producir un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por ejemplo se ha postulado que cambios en el pHi o un cambio en el estado de

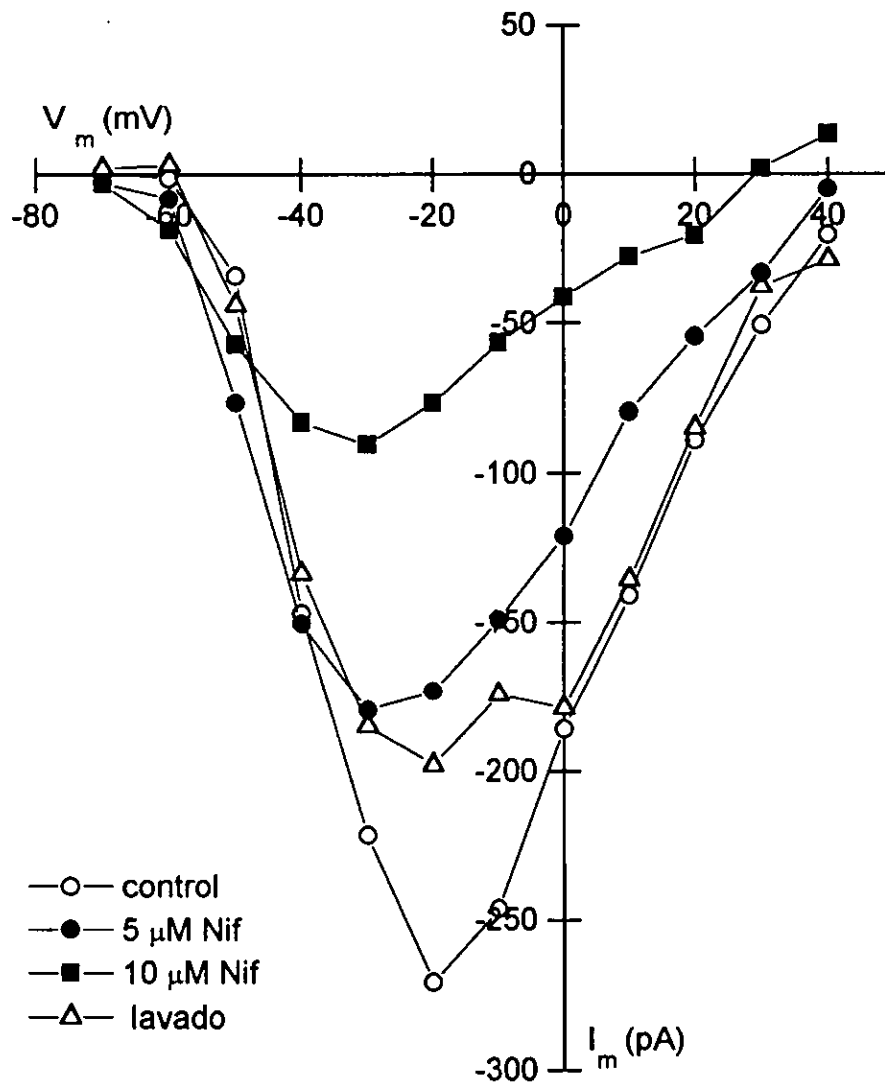


Fig. 51 Efecto de la nifedipina (Nif) sobre las corrientes de Ca^{2+} . Curvas I-V obtenidas de una misma célula antes y después de la aplicación en el baño de 5 y 10 μM de nifedipina. La nifedipina produce una disminución del pico de la corriente.

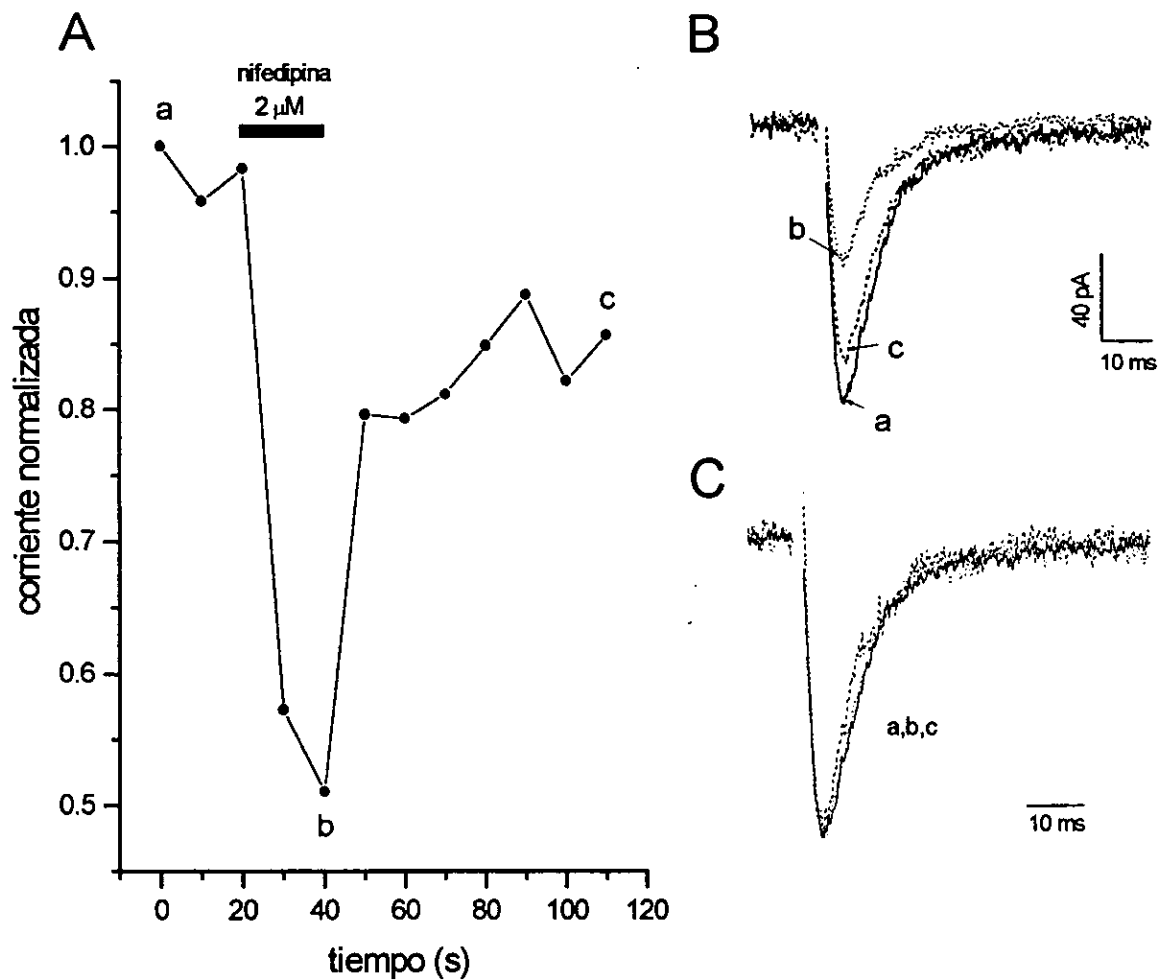


Fig. 52 Efecto de la aplicación aguda de nifedipina sobre las corrientes de Ca^{2+} . **A:** Gráfica del pico de las corrientes de Ca^{2+} producidas por pulsos depolarizantes a -20 mV y monitoreadas cada 10 s. En el momento indicado por la barra se aplicó $2 \mu\text{M}$ de nifedipina durante 20 s por medio de una pipeta colocada cerca de la célula en estudio. **B:** trazos a-c: corrientes obtenidas en los puntos a-c del panel A. **C:** los trazos a-c se normalizaron con respecto a la amplitud pico para facilitar la comparación de las cinéticas de activación e inactivación. No hay cambio en la cinética luego de la aplicación de nifedipina.

fosforilación del canal podrían afectar drásticamente sus propiedades biofísicas (umbral de activación, velocidad de inactivación, aumento de la corriente de ventana).

Por otra parte, nos preguntamos acerca de la posible contribución de las CCVD tipo T en el transitorio de Ca^{2+} inducido por la alcalinización intracelular. Con el fin de explorar la posibilidad de que la alcalinización intracelular afecte las corrientes de Ca^{2+} , registramos estas corrientes en células espermatogénicas usando soluciones internas ajustadas a 2 valores diferentes de pH: (7.4 y 8.1). También se exploró el efecto de la alcalinización externa utilizando una solución extracelular ajustada a pH 8.1. Los resultados pueden verse en la fig. 53 A, la cual ilustra las densidades de corriente máximas obtenidas en las diferentes condiciones experimentales. Cuando el pH aumenta de 7.4 a 8.1 ($\text{pHe} = 7.35$), la densidad de corriente máxima aumenta significativamente, de 7.52 ± 0.41 a $9.06 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Un incremento aún mayor (a $9.52 \pm 0.41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) se observa cuando el pH extracelular (pHe) aumenta de 7.35 a 8.1 (a $\text{pHi} = 7.35$). La densidad de corriente en células registradas usando una solución interna a $\text{pH} = 6.5$ (cercano al valor del pHi medido en estas células en reposo) fue de $7.45 \pm 0.22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=3$). Este valor no es significativamente diferente del obtenido a $\text{pHi} = 7.35$. La fig. 54 B ilustra familias representativas de corrientes de Ca^{2+} obtenidas a pHi 7.1, 8.1 y $\text{pHe} = 8.1$.

La fig. 54 A muestra las curvas I-V promedio de estos 3 grupos de experimentos. El aumento del pHi de 7.4 a 8.1 incrementa significativamente la amplitud máxima de la densidad de corriente (de 6.31 ± 0.83 a $8.49 \pm 0.25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) (fig. 54 A), sin observarse desplazamientos de la curva I-V. Un incremento mayor se produce al aumentar el pHe de 7.35 a 8.1 (a $9.62 \pm 0.61 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Además de este aumento en la densidad de corriente máxima, el pico de la curva I-V se desplaza aprox 5 mV hacia potenciales más hiperpolarizados, cuando se produce este incremento en el pHe (ver fig. 54 A). La dependencia del voltaje de la activación y de la inactivación en estado estacionario de estas corrientes de Ca^{2+} se determinaron para los 3 grupos experimentales. Los resultados aparecen resumidos en la tabla 2. La alcalinización extracelular de $\text{pHe} = 7.35$ a $\text{pHe} = 8.1$ produce un desplazamiento de 5 mV hacia potenciales más negativos del $V_{s1/2}$ (potencial al cual se obtiene la mitad de la activación máxima) sin producir cambios en el $V_{i1/2}$. La alcalinización intracelular en el mismo rango de pH no afecta la dependencia del voltaje

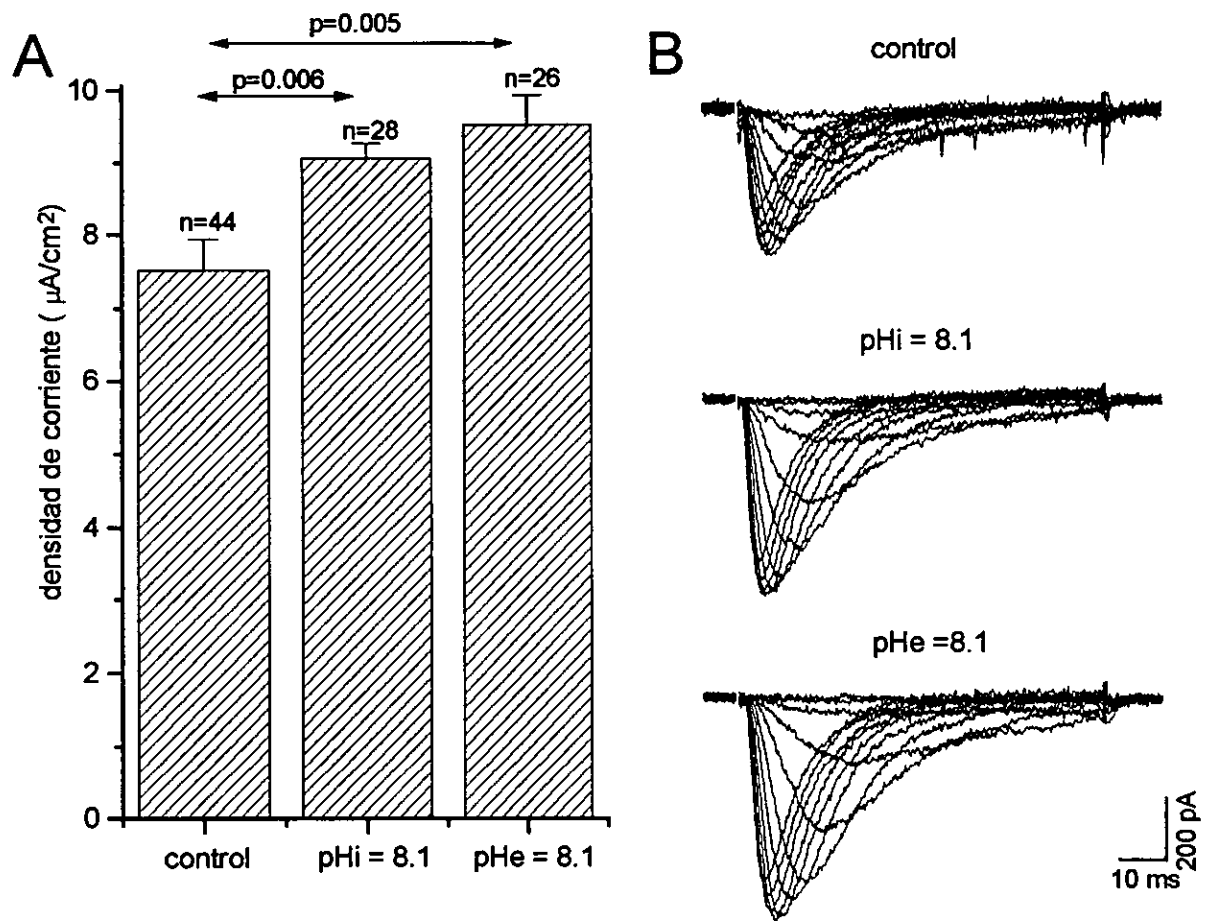


Fig. 53 Efecto del pH sobre las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatogénicas. A: Densidad de corriente máxima obtenidas a dos pHi diferentes (7.4 y 8.1), así como a pHe= 8.1. La densidad de corriente aumenta de 7.52 ± 0.41 a $9.06 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ cuando el pHi aumenta de 7.4 a 8.1 y a $9.52 \pm 0.41 \text{ mA}/\text{cm}^2$ cuando el pHe aumenta de 7.35 a 8.1. **B** Familias representativas de corrientes de Ca^{2+} , obtenidas a pHi = 7.4 y 8.1 así como a pHe = 8.1. Se utilizaron pulsos de 100 ms desde -70 mV hasta -15 mV en pasos de 5 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se utilizó el protocolo p/4 para reducir las corrientes de fuga y capacitiva.

de la activación y la inactivación. Los factores de pendiente k_a y k_i no se vieron afectados por los cambios de pHi ni de pHe.

Con el fin de explorar los efectos del pHi y pHe sobre la dependencia del voltaje de la inactivación, se calcularon las constantes de inactivación (τ_h) de las corrientes de Ca^{2+} obtenidas a diferentes potenciales. Los resultados se muestran en la fig. 54 B. Los datos correspondientes a pHe = 8.1 se graficaron con un desplazamiento de 5 mV en dirección positiva para compensar el desplazamiento negativo observado en la dependencia del voltaje de estos canales a este valor de pHe. Como se mostró anteriormente τ_h disminuye al depolarizar, mostrando una gran dependencia del voltaje el rango entre -45 y 0 mV. En el grupo de células control τ_h mostró una reducción en un factor e al cambiar V_m en 6.18 mV. Este valor fue de 6.86 mV para el grupo de células registradas a pHe = 8.1 y de 10.77 para el grupo registrado a pHi = 8.1. A -40 mV la τ_h de las células registradas tanto a pHi como pHe 8.1 fue significativamente más rápida que en las condiciones control: 15.07 ± 1.19 ms (media \pm DE; n=8 pHe = 8.1) y 14.57 ± 0.47 ms (media \pm DE; n= 13, pHi = 8.1), versus 20.19 ± 3.12 (media \pm DE, n=8, control). Sin embargo todas se hacen virtualmente idénticas a potenciales más positivos que -30 mV, independientemente del pH (ver fig. 54 B). Este hallazgo se ilustra en la fig. 54 C en la cual los trazos de corriente al pico de las tres curvas I-V que se muestran parte A fueron normalizados. Los trazos prácticamente se superponen unos con otros. La principal conclusión de este grupo de resultados es que la cinéticas de activación e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} no se ven afectadas de manera importante por la alcalinización a cualquier lado del canal.

Como se señaló anteriormente el canal T podría contribuir al transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular si el aumento de pHi produjese uno o más de los siguientes efectos: a) enlentecimiento de la cinética de inactivación del canal b) cambio en la dependencia del voltaje de la activación y/o la inactivación en forma tal de aumentar la corriente de ventana. Nuestros datos demostraron que la alcalinización intracelular no produce ninguno de estos cambios, por lo que pensamos que la actividad de los canales T no contribuye mayormente al transitorio inducido por alcalinización. Por la misma razón, no creemos que éstos tampoco sean capaces de determinar por sí mismos un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

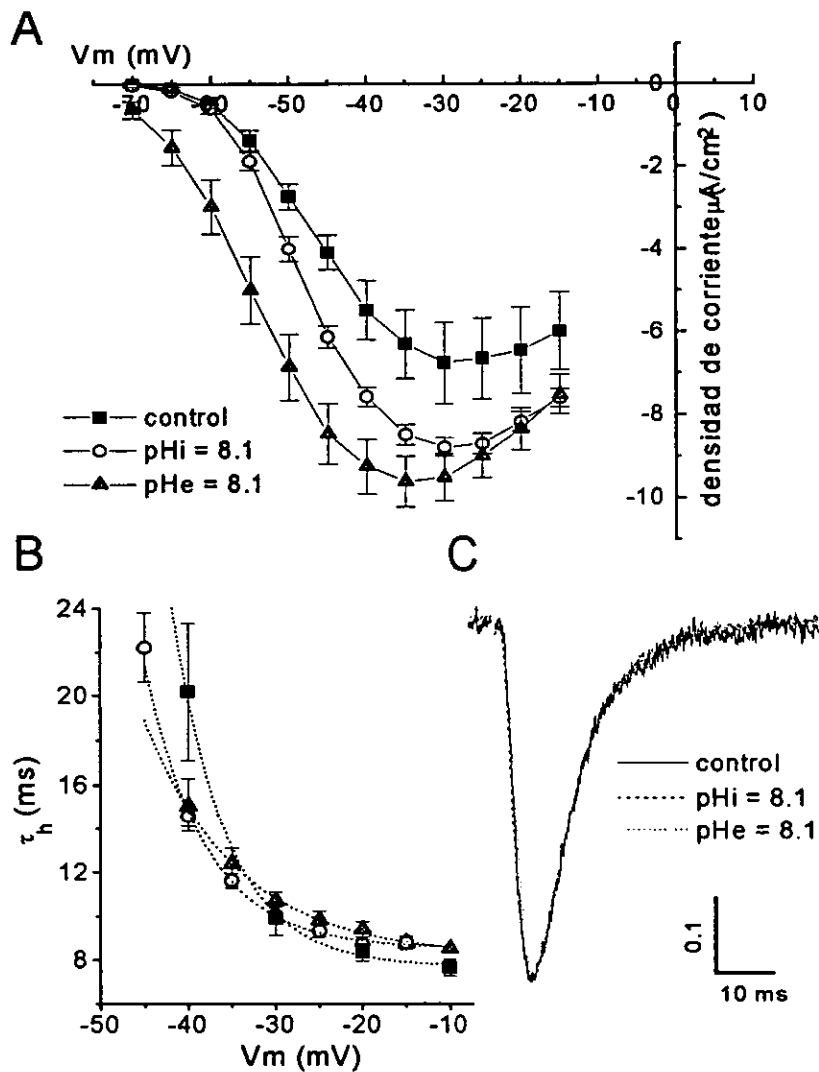


Fig. 54 Efecto del pH en la relación I-V de las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatogénicas. A: Curva I-V de la corriente al pico obtenida de espermatoцитos en condiciones control y luego de aumentar el pH tanto externo como interno a 8.1. Cuando el pH_e cambia de 7.35 a 8.1 el pico de la densidad de corriente aumenta significativamente y la curva I-V se desplaza 5 mV en dirección hiperpolarizante. En cambio, la alcalinización intracelular aumenta el pico de densidad de corriente sin afectar la dependencia del voltaje de los canales. **B:** Dependencia del voltaje de la constante de inactivación (τ_h) de la corriente de Ca^{2+} registrada en las tres condiciones que se muestran en A. las líneas punteadas representan los ajustes exponenciales de los datos. **C:** Trazos de las corrientes de Ca^{2+} obtenidos al pico de las curvas I-V bajo condiciones control (trazo continuo), y luego de alcalinización externa (trazo punteado) o interna (trazo discontinuo). Los trazos se normalizaron a la amplitud pico y se superpusieron para facilitar su comparación. Véase que las cinéticas de activación e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} no se afectan por la alcalinización en cualquiera de los lados del canal

Tabla 2

	$V_{a1/2}$ (mV)	k_a	$V_{i1/2}$ (mV)	k_i
Control	-43.66 ± 1.6	6.48 ± 0.23	-61.0 ± 2.18	5.4 ± 0.7
pHi 8.1	-43.94 ± 0.6	6.32 ± 0.1	-58.08 ± 0.8	4.19 ± 0.27
pHo 8.1	-48.5 ± 1.15	7.35 ± 0.3	-60.84 ± 0.96	5.08 ± 0.43

Desde luego la prueba más directa para validar o descartar la participación de los canales de Ca^{2+} de tipo T en el transitorio de Ca^{2+} inducido por la alcalinización intracelular sería contar con bloqueadores específicos para estos canales. Estos desafortunadamente no se conocen todavía.

V DISCUSION

Ca²⁺ y pHi como segundos mensajeros intracelulares

Una de las propiedades más importantes de cualquier célula es su capacidad para interactuar con otras células del organismo y con el entorno que las rodea. Esta comunicación está mediada por una serie de señales químicas primarias que llegan a la superficie celular. Estas señales, actuando a través de segundos mensajeros, afectan diferentes comportamientos de la célula como la división celular, la secreción y la motilidad. En la fisiología del espermatozoide tanto el Ca²⁺ como el pHi tienen gran importancia dado que en diversas etapas del proceso de fecundación ocurren importantes cambios en la [Ca²⁺]_i y en la [H⁺].

El Ca²⁺ es uno de los segundos mensajeros más importantes en estos procesos de señalización intracelular desde bacterias a neuronas. Este ion regula procesos claves como expresión génica, secreción, contracción y metabolismo celular. Los aumentos en la [Ca²⁺]_i son importantes en los procesos de maduración, diferenciación y proliferación de múltiples tipos celulares incluyendo los espermatozoides. En el caso que nos ocupa este ion cumple un papel muy importante en el proceso de fecundación.

Dado que el Ca²⁺ no puede ser metabolizado como otros segundos mensajeros, las células deben regular finamente sus niveles intracelulares a través de proteínas de unión y de mecanismos de extrusión de dicho ion. Los niveles normales de [Ca²⁺]_i son de alrededor de 100 nM, es decir, 20.000 veces más bajos que su concentración extracelular (2 mM). Un argumento en favor de la importancia de la regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺, es que dado que este ion precipita fosfatos (principal fuente de energía del metabolismo intracelular), sus niveles intracelulares deben mantenerse extremadamente bajos. Las células en un principio pudieron haber desarrollado mecanismos para mantener baja la concentración de este ion para luego utilizarlo como mensajero en los mecanismos de transducción intracelular (Clapham, 1995). Debido a la abundancia, afinidad y especificidad de las proteínas que unen Ca²⁺, éste puede llegar a ser un segundo mensajero extremadamente localizado. Se estima que la difusión del Ca²⁺ es

muy lenta y que migra no más de 0.1-0.5 μm durante los 50 μs que tarda antes de encontrar una proteína de unión, (asumiendo $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una concentración de proteínas de unión de 300 μM (Allbitron y col., 1992). La difusión del Ca^{2+} también depende del grado de saturación de las proteínas de unión existentes y varía de 15-65 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Sin embargo la célula no es un volumen homogéneo, dado que los amortiguadores de Ca^{2+} parecen estar distribuidos de manera no uniforme.

Prácticamente todos los procesos celulares pueden verse afectados por el pH intracelular, incluyendo el metabolismo celular; el potencial de membrana; el crecimiento celular; el transporte de sustancias a través de la membrana; el estado de polimerización del citoesqueleto; la capacidad de contracción de las células musculares. Los cambios de pH también afectan las respuestas de la células a diferentes efectores como factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores.

También es muy importante el hecho de que cambios en el pH puedan afectar los niveles de otros mensajeros intracelulares como AMPc y Ca^{2+} . Se ha visto que la alcalinización intracelular produce un modesto aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células musculares lisas en cultivo, (Siskind y col., 1989), células endoteliales (Danthuri y col., 1990), células HT29 de carcinoma de colon (Nitschke y col., 1996), células de glándula lacrimal de rata (Yodozawa y col., 1997), linfocitos de rata (Grinstein y Goetz, 1985), así como en varios tipos de neuronas y células neuroendocrinas. Algunos transportadores regulados por el pH contribuyen asimismo en la regulación del volumen celular. Diversas proteínas de membrana se especializan en el transporte de ácidos y bases regulando así el pH. Estos mecanismos de transporte se dividen en 5 grupos 1) aquellos como el intercambiador Na^+/H^+ que intercambian H^+ por otro catión. Este intercambiador responde a la acidificación celular sacando un H^+ y metiendo un Na^+ con una estequiometría de 1:1 por lo que es electroneutro. En este grupo también está el intercambiador K^+/H^+ , que saca K^+ y mete H^+ produciendo acidificación intracelular. 2) En otro grupo están los mecanismos que mueven HCO_3^- , tales como el intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ el cual se activa por alcalinización intracelular produciendo acidificación, el intercambiador $\text{Na}^+ + \text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ el cual alcaliniza al transportar Na^+ al interior, y un cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico. 3) En el tercer grupo están las H^+ -ATPasas que bombean protones hacia el

exterior consumiendo energía. 4) Otro grupo está compuesto por proteínas que cotransportan bases débiles aniónicas con Na^+ . Estos mecanismos co-transportan Na^+ con una base débil aniónica orgánica como lactato o piruvato. Estos transportadores podrían causar alcalinización intracelular debida a la entrada de bases, que en el interior de la célula captarían protones. 5) Finalmente, estarían los que intercambian bases débiles aniónicas por Cl^- , como el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{formato}$ presente en las células del túbulo renal proximal el cual promueve la entrada de Cl^- y la salida de formatos produciéndose así acidificación celular (Putnam, 1995).

En cuanto al papel del pH y el Ca^{2+} intracelular en la fecundación, se sabe que ambas variables juegan un papel muy importante. Por ejemplo, se ha reportado que aumentos de pHi modulan la motilidad del flagelo en espermatozoides de varias especies de animales (Shapiro y col., 1990; Darszon y col., 1996). Por otra parte, tanto la capacitación como la RA de los espermatozoides de mamífero requieren un aumento del pHi (Meizel y Deamer, 1978; Working y Meizel, 1983; Vrederbergh y Parrish, 1995; Zeng y col., 1996; y Darszon y col., 1996,1998). A su vez, tanto la capacitación como la RA requieren un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (Baldi y col., 1996; Darszon y col., 1996,1998).

En el espermatozoide, tanto el pHi como el Ca^{2+}_i están controlados por mecanismos interrelacionados. En el espermatozoide del erizo de mar se ha visto que la gelatina del óvulo es capaz de inducir aumentos en el pHi que dependen de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$. En ausencia de Ca^{2+} externo o en presencia de DHP, el factor no produce aumento de pHi (Guerrero y col., 1998). A su vez, es posible inducir la entrada de Ca^{2+} en estas células alcalinizándolas con NH_4^+ . Se desconoce si éste es un efecto directo o indirecto sobre los canales de Ca^{2+} . El tratamiento de espermatozoides de erizo de mar con un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína de membrana de 210 kD produce aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin producir un aumento concomitante del pHi . En estas condiciones, no se produce RA a menos que en paralelo se induzca un aumento de pHi con NH_4Cl (Trimmer y col., 1986a; Trimmer y col., 1986b). Sin embargo, el NH_4^+ sólo es capaz de producir exocitosis cuando se aplica en concentraciones suficientemente altas. Este tipo de RA también es inhibida por bloqueantes de canales de Ca^{2+} (García Soto y col., 1987; García-Soto y Darszon, 1985)

Los valores de pH_i en espermatozoides de mamífero en reposo medidos mediante colorantes sensibles a pH son relativamente ácidos comparados a los que se observan en células somáticas (Zeng y col., 1996; Babcock y Pfeiffer, 1987). Utilizando BCECF como indicador de pH , Florman y col. reportaron, para espermatozoides de ratón en reposo un valor promedio de pH_i de 6.54 ± 0.08 . Durante su almacenamiento en la porción caudal del epidídimo los espermatozoides deben mantener su viabilidad y suprimir la RA espontánea. Se ha propuesto que el pH_i ácido contribuye a mantener estas células en un estado no capacitado (Parrish y col., 1989). La relativa acidez intracelular también se ha asociado con una mayor viabilidad (Yanagimachi, 1988). El pH_i ácido es probablemente consecuencia de una alta tasa de generación de protones producto del metabolismo celular que ocurre aún durante el período de almacenamiento en el epidídimo (Cardullo y Cone, 1986), y de una disminución en la exportación de productos monocarboxilados de la glicólisis (García y col., 1994). Por lo tanto, estas células no parecen requerir mecanismos o vías de entrada específicos de protones para mantener ácido su medio intracelular.

En espermatozoides de bovino y ratón la mayor parte del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la ZP3 (glicoproteína de la matriz extracelular del óvulo) que ocurre durante la RA es modulado por el pH_i y es sensible a Ptx (Endo y col., 1988, Florman y col., 1989, Arnoult y col., 1996). Los cambios de pH_i inducidos por ZP3 se bloquean con Ptx, lo cual sugiere que las proteínas G_i regulan alguna etapa inicial de la RA (Arnoult y col., 1996).

Se ha propuesto que en la RA del espermatozoide del erizo de mar participan dos tipos de canales de Ca^{2+} . El primero se activa transitoriamente cuando la gelatina del óvulo se une al receptor y se bloquea con verapamil y DHP. El segundo se activa más tardíamente, no presenta inactivación, no se bloquea por DHP, se bloquea con Ni^{2+} y Co^{2+} y es menos selectivo que el primero, permitiendo el pasaje de Mn^{2+} . Aquellas condiciones que inhiben el aumento de pH_i , bloquean el tanto segundo canal como la RA. Por lo tanto, se supone que este segundo canal estaría modulado por el pH_i . (Guerrero y Darszon, 1989a,b).

En la RA del espermatozoide de mamífero también se ha implicado la participación de más de un tipo de canales de Ca^{2+} (Florman y col., 1994): una vía no dependiente del

voltaje, que permite el pasaje de otros cationes divalentes y se bloquea con Cd^{2+} y Ln^{3+} y otra que tiene las características de un CCVD (Florman y col., 1994; Arnoult y col., 1996).

Toda esta información sugiere que una vía de permeabilidad al Ca^{2+} modulada por el pH*i* podría participar en la capacitación y en la inducción de la RA en espermatozoides de mamífero.

Uso de células espermatogénicas como modelo de los espermatozoides.

Los espermatozoides son células muy pequeñas y de geometría compleja, lo cual hace sumamente difícil el estudio de sus corrientes iónicas usando las técnicas electrofisiológicas convencionales. Por otra parte, la detección de señales fluorescentes es poco confiable debido al pequeño volumen de estas células, lo cual determina una mala relación señal-ruido. Además, los espermatozoides son células terminales que ya no son capaces de sintetizar proteínas. Las células espermatogénicas, especialmente aquellas que se encuentran en las etapas más avanzadas, pueden considerarse una buena aproximación al espermatozoide maduro, dado que probablemente un número importante de sus proteínas de membrana se conserven en el espermatozoide maduro (Darszon y col., 1996, 1998). Las células espermatogénicas tienen la ventaja de ser más grandes, lo cual facilita el registro de corrientes iónicas usando la técnica de fijación de potencial en célula completa. Asimismo se facilita el registro de señales fluorescentes en células cargadas con indicadores fluorescentes sensibles a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y al pH. Por otra parte, estas células son transcripcionalmente activas, lo cual permite realizar estudios de expresión génica y ensamblaje de proteínas de interés. En 1984 Hagiwara y Kawa reportaron los primeros registros de corriente iónicas en células espermatogénicas de rata. Estos autores demostraron que las células poseen corrientes entrantes de Ca^{2+} y de K^+ y sugirieron que las primeras van aumentando mientras que las segundas van disminuyendo a medida que las células maduran y se diferencian. Este hallazgo sugiere que la expresión diferencial de canales iónicos durante la espermatogénesis podría influir en la diferenciación de estas células (Hagiwara y Kawa, 1984). En su trabajo estos autores afirman que “genes y

canales iónicos considerados característicos de células excitables pueden expresarse y funcionar en estados tempranos de la embriogénesis". Esta predicción es correcta dado que se ha demostrado la expresión de CCVD y de un canal de K^+ sensible a pH_i en células espermatogénicas de ratón (Schreiber y col., 1997). Estos canales podrían estar presentes en el espermatozoide maduro determinando algunas de sus propiedades electrofisiológicas.

Por todas estas razones, nuestros estudios se llevaron a cabo en células espermatogénicas de ratón.

Parte A: Una vía de influjo de calcio activada por alcalinización intracelular está presente en las células espermatogénicas del ratón.

Los experimentos que se llevaron a cabo durante este proyecto tuvieron como propósito el evaluar la influencia de la alcalinización intracelular en los niveles de Ca^{2+} de las células espermatogénicas aisladas de testículo de ratón.

Los resultados obtenidos indican que estas células presentan una vía de influjo de Ca^{2+} activada por la alcalinización intracelular. La magnitud de los transitorios de Ca^{2+} obtenidos cuando se exponen las células a la alcalinización por una base débil, como el NH_4Cl , aumenta gradualmente conforme progresa la maduración de dichas células. Esto sugiere la posible participación de dicha vía de entrada de Ca^{2+} en la fisiología del espermatozoide maduro. Esta vía de entrada de Ca^{2+} permite además el paso de otros cationes divalentes como Ba^{2+} , Sr^{2+} y Mn^{2+} y se bloquea con Ni^{2+} y Cd^{2+} pero no con nifedipina.

Origen de los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por alcalinización intracelular

Varios posibles candidatos pueden ser responsables del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por alcalinización intracelular:

Reservorios intracelulares de Ca^{2+}

El aumento de Ca^{2+} intracelular se podría deber a la salida de Ca^{2+} de depósitos internos, bien por efectos sobre los canales de liberación o sobre las bombas de Ca^{2+} de los mismos. La liberación de Ca^{2+} se podría amplificar por el fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} muy bien caracterizado en miocitos cardíacos (Fabiato, 1985; Nabauer y col., 1989) y también presente en neuronas (Hernández-Cruz y col., 1997). De acuerdo con este mecanismo, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induce más liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. La liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares está mediada por dos tipos de receptores o canales de liberación: el receptor de inositol trifosfato (IP_3) y el receptor de Rianodina (RyR). Aunque relacionados, estas dos clases de receptores pertenecen a diferentes familias y son codificados por varios genes.

Receptor de Rianodina. Este canal intracelular de Ca^{2+} está codificado por una familia pequeña de genes denominados RyR1, RyR2 y RyR3. El primer tipo (codificado por RyR1) se expresa predominantemente en músculo esquelético y está acoplado, al parecer mecánicamente, al sensor de voltaje (un receptor de dihidropiridina modificado), formando parte de la maquinaria del acoplamiento excitación-contracción (Ríos y Brum, 1987). El segundo tipo (codificado por RyR2), está asociado al proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en músculo cardíaco y sistema nervioso. El canal codificado por RyR3 tiene un bajo nivel de expresión en numerosos tejidos incluyendo cerebro y músculo liso. Todos estos canales forman estructuras tetraméricas.

El canal de liberación de Ca^{2+} conocido como receptor de Rianodina parece tener un papel significativo en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular. Los ratones homocigotos con una mutación inactivante en RyR1 mueren prematuramente presentando grandes anomalías del músculo esquelético. Las respuestas contráctiles de estos músculos a la estimulación eléctrica se encuentran totalmente abolidas, lo cual demuestra el papel fundamental que cumple dicho receptor en el acoplamiento E-C en músculo esquelético. Los receptores RyR2 y RyR3 no pueden suplirlo en su función.

En cuanto a la modulación de dichos receptores, existe una gran variedad de moduladores endógenos y exógenos. El Rojo de Rutenio y el Mg^{2+} y la rianodina son inhibidores típicos de este receptor. El Ca^{2+} es el modulador fisiológico mejor estudiado

del receptor de Rianodina, aumentando su probabilidad de apertura en un rango amplio de $[Ca^{2+}]_i$. En muchas preparaciones los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP, ADP ribosa cíclica) activan estos canales (para más detalles sobre el receptor de rianodina ver E. Conley, 1996a).

Receptor de IP_3 . Los canales de liberación de Ca^{2+} denominados receptores de IP_3 median la liberación de Ca^{2+} desde una clase de reservorios intracelulares, al parecer diferente de los que contienen receptores de Rianodina. El IP_3 se origina a partir de la hidrólisis de fosfoinosítidos en la membrana plasmática. Esta hidrólisis, llevada a cabo por la fosfolipasa C se inicia por la activación de proteínas G, a su vez originada por la unión de agonistas a receptores de neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ resultante produce numerosos efectos, tales como la activación de enzimas y la apertura de canales iónicos, así como la proliferación y diferenciación celulares. Se conocen tres genes diferentes que codifican para los receptores de IP_3 denominados I, II y III. Cada una de estas proteínas se asocia en complejos tetraméricos para formar canales de liberación de Ca^{2+} (Conley, 1996b).

En las células no excitables como las células sanguíneas, hepatocitos y células endoteliales, la movilización de Ca^{2+} puede estar mediada por los receptores de IP_3 . Dos tipos de receptores acoplados a proteínas G así como a receptores con actividad de tirosin cinasa producen liberación de IP_3 . Los receptores acoplados a las proteínas G activan la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$), mientras que los receptores con actividad tirosin cinasa estimulan la fosfolipasa $C\gamma$. Ambos mecanismos originan, a partir de fosfatidilinositol bifosfato el IP_3 y el diacilglicerol (DCG) (Berridge y Irvine, 1989). El IP_3 actúa como segundo mensajero intracelular uniéndose a receptores de IP_3 presentes en el retículo endoplásmico y disparando la liberación de Ca^{2+} de dichos reservorios. Se ha reportado la presencia de proteínas $Gq_{\alpha 11}$ y fosfolipasa C $\beta 1$ ($PLC\beta 1$) en la parte anterior del acrosoma de espermatozoides de diversas especies de mamíferos (Walensky y Snyder, 1995). En este mismo trabajo los autores inmunolocalizan receptores de IP_3 en el acrosoma de espermatozoide y presentan experimentos que interpretan como liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 en espermatozoides permeabilizados con digitonina. Asimismo muestran estimulación por tapsigargina de la RA, supuestamente debida a liberación de Ca^{2+} de

reservorios sensibles a IP_3 localizados en el acrosoma. En algunos tipos celulares se ha descrito la presencia de receptores de IP_3 en la membrana plasmática (Khan y col., 1992).

El fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} es sensible al pH, con un pH óptimo en el rango alcalino > 7.2 (Meissner, 1994). A su vez se ha reportado que la alcalinización aumenta la liberación de Ca^{2+} por el receptor de IP_3 en fibras musculares lisas peladas (Tsukioka, et al., 1994). Más aún, estudios en bicapas lipídicas han mostrado que la actividad tanto del receptor de Rianodina como del de IP_3 son muy dependientes del pH activándose ambos con la alcalinización (Fill y col., 1989).

Sin embargo, como se muestra en este trabajo, la mayor parte de la movilización de Ca^{2+} inducida por alcalinización de las células espermatogénicas proviene del medio extracelular, sin una contribución significativa de los reservorios intracelulares. En un trabajo realizado en paralelo (Treviño y col., 1998) examinamos la densidad y distribución subcelular de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares en diferentes etapas de la espermatogénesis usando microscopía confocal y derivados fluorescentes de tapsigargina y rianodina. Ambos indicadores fluorescentes mostraron una escasa pero característica distribución en cisternas del retículo endoplásmico (RE), membrana nuclear y complejo de Golgi de las células espermatogénicas más maduras. La escasa tinción concuerda con la modesta cantidad de Ca^{2+} que puede liberarse farmacológicamente de estos reservorios, sugiriendo que el factor limitante es el bajo número de reservorios más que su estado de llenado. En este estudio encontramos que en las células espermatogénicas, desde espermatogonias hasta espermátides condensadas está presente el ARN mensajero para los tres tipos de receptores de IP_3 . Usando anticuerpos contra los tres tipos de receptores de IP_3 , el análisis inmunocitoquímico muestra diferentes patrones de distribución durante la espermatogénesis. En las células más inmaduras (espermatogonias) la distribución es homogénea en todo el citoplasma, y a medida que la diferenciación progresa la tinción es menos extensa localizándose mayoritariamente en el complejo de Golgi. Consistentemente con esta distribución, estas células presentan un mayor incremento de $[Ca^{2+}]_i$ frente a la aplicación de un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa del RE (tapsigargina), que las células más maduras, sugiriendo que quizás estos reservorios tengan importancia en los procesos de proliferación. Curiosamente estas células no presentan aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta

a la alcalinización intracelular, sugiriendo que quizás la vía de permeación de Ca^{2+} no está presente en las etapas tempranas de la diferenciación. Todos estos resultados indican que los reservorios intracelulares no parecen contribuir mayormente en forma directa al aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por alcalinización intracelular en las células espermatozógenicas de animales adultos

Canales de Ca^{2+} activados por el voltaje

Como se mostró en los resultados y se discute más adelante, las células espermatozógenicas parecen expresar un solo tipo de CCVD, correspondiente a los canales de Ca^{2+} de tipo T. Los hidrogeniones son importantes reguladores fisiológicos del flujo iónico a través de los canales de Ca^{2+} . Varios reportes han mostrado que la concentración de protones a ambos lados del canal modula de manera importante las corrientes acarreadas por canales de Ca^{2+} de tipo L (Krafte y Kass, 1988; Kaibara y Kameyama, 1988; Klockner y Isenberg, 1994). Existe un solo trabajo en el que se estudia el efecto de los protones sobre los canales de Ca^{2+} de tipo T en miocitos cardíacos. En ese trabajo, Tytgat y col. (1990) encontraron que la acidificación reduce las corrientes de Ca^{2+} tipo T mientras que la alcalinización las aumenta. Al aumentar el pHe de 7.4 a 8.0 se incrementan la densidad de corriente y la conductancia máxima (g_{max}) por un factor de dos. Tanto el pico de la curva I-V como el voltaje que produce la mitad de la activación máxima ($V_{a1/2}$), se desplazan 5 mV hacia potenciales más negativos. En contraste, estas corrientes no se ven afectadas por cambios en el pH_i en el rango de 6.5 a 8.0.

Los resultados obtenidos en las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatozógenicas están en perfecto acuerdo con los obtenidos por Tytgat y col. en lo que respecta a la modulación de las corrientes por el pHe. Sin embargo nosotros encontramos que el pH_i sí produce un aumento pequeño pero significativo de la densidad de la corriente T en las células espermatozógenicas, sin afectar la dependencia del voltaje de la activación ni de la inactivación. Dada la gran similitud en la dependencia al pH de las corrientes de tipo T en los cardiomiocitos y en las células espermatozógenicas, es probable que los mismos mecanismos estén involucrados en la modulación de estos canales por el pH. Experimentos realizados en canales de Ca^{2+} tipo L mutados indican que los protones

externos bloquean el canal interactuando con un sitio ubicado en la vía de permeación (Chen y col., 1996). Dado que el sitio de protonación se encuentra en el poro y ésta es la región más conservada de todas las subunidades α_1 clonadas de los canales de Ca^{2+} , es probable que la sensibilidad al pH de los canales de Ca^{2+} de tipo T tenga las mismas bases moleculares.

Puede el efecto del pH sobre los canales de Ca^{2+} explicar el transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular?

Nuestros resultados muestran que cuando las células espermatozógenas se alcalinizan intracelularmente tanto la cinética como la dependencia del voltaje de las CCVD tipo T permanece incambiada. El pequeño incremento observado en la densidad de corriente producido por aumento del pH_i podría contribuir en algo al aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero quizás no lo suficiente para explicar el transitorio de Ca^{2+} .

En cambio, la alcalinización extracelular si podría tener una repercusión fisiológica, dado que no sólo se incrementa la densidad de corriente sino que también se produce un desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales más negativos. Este último efecto podría aumentar de manera significativa la corriente de ventana, posibilitando un mayor influjo sostenido de Ca^{2+} en ese rango de potenciales de membrana. En células cardíacas el pH_e produce cambios en la g_{max} con un pK_a aparente en el rango de 7.1-7.5 para los canales de Ca^{2+} de tipo T, mientras que para los canales L, de las mismas células el pK_a aparente es de alrededor de 5.2. Esta diferencia indica que cerca del rango fisiológico de pH_e los canales de Ca^{2+} tipo de T son más sensibles al pH que los de tipo L. Esto puede tener gran importancia para los espermatozoides, ya que en su viaje a través del epidídimo y del tracto genital femenino enfrentan cambios significativos del pH.

Estos resultados, al igual que la incapacidad de la nifedipina para bloquear el transitorio de Ca^{2+} , sugieren que la participación de los canales de tipo T como principal responsable de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la alcalinización intracelular es improbable.

Todo indica que las células espermatogénicas presentan por lo menos dos vías de entrada de Ca^{2+} diferentes. Como se discutirá más adelante, ambas podrían tener un papel relevante en la RA acrosomal del espermatozoide de ratón. Asimismo podrían participar en los procesos de proliferación y diferenciación de las células espermatogénicas.

Posible papel del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es un sistema de transporte de gran importancia en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Las primeras evidencias sobre la presencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ provienen de los trabajos de Luttgau y Niedergerke en 1958. Este transportador es electrogénico y en el músculo cardíaco intercambia 3 Na^+ por 1 Ca^{2+} , movilizándolo una carga neta positiva hacia el interior. La electrogenicidad del sistema hace que éste actúe como un generador de corriente cuya dirección dependerá del potencial de reversión del sistema (E_r), el cual está dado por la siguiente expresión:

$$E_r = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$$

siendo

$$E_{\text{Na}} = RT/F \ln [\text{Na}^+]_e / [\text{Na}^+]_i \quad \text{y}$$

$$E_{\text{Ca}} = RT/2F \ln [\text{Ca}^{2+}]_e / [\text{Ca}^{2+}]_i$$

La corriente generada por el intercambiador es proporcional a la diferencia entre $E_r - V_m$, siendo V_m el potencial de membrana. A potenciales más negativos que el potencial de reversión del intercambiador ocurre una salida neta de Ca^{2+} (modo directo de operación del intercambiador), mientras que potenciales más positivos que E_r , ocurre la entrada de Ca^{2+} (modo reverso de operación).

Una de las características más importantes del intercambiador es su baja afinidad por Ca^{2+} comparada con la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Esto determina que el intercambiador sea poco activo a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ submicromolares y que se active a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el

rango micromolar. En células intactas la activación del intercambiador por Ca^{2+} extracelular (modo reverso) es aún de menor afinidad (rango milimolar), reflejando la marcada asimetría del intercambiador. En células intactas el intercambiador es capaz de interactuar con distintos iones además de los iones transportados, (Na^+ y Ca^{2+}) incluyendo: Mg^{2+} , cationes monovalentes (Dipolo, 1996)

El ATP activa al intercambiador con baja afinidad ($K_{0.5} = 250 \mu\text{M}$) produciendo un aumento de la afinidad de los sitios de transporte de Na^+ y Ca^{2+} , así como un aumento de la afinidad del sitio regulatorio para el Ca^{2+} intracelular.

El Mg^{2+} intracelular a concentraciones fisiológicas tiene un efecto inhibitorio sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en todos sus modos de operación. El Mg^{2+} ejerce su efecto inhibitorio sólo del lado citoplasmático tratándose de una inhibición de tipo no competitivo de la unión con Ca^{2+} .

En cuanto a los efectos del pH sobre el intercambiador, se sabe que la alcalinización intracelular produce una marcada activación de ambos modos de operación del intercambiador. Por el contrario la acidificación intracelular produce una inhibición del intercambiador. La actividad del intercambiador se encuentra parcialmente detenida en el rango de pHi fisiológicos, está completamente inhibida por debajo de pH 6.0 y es máxima a pH 9.0 (Doering y Lederer, 1993; Doering y col., 1996). El intercambiador es tres veces más sensible a los cambios de pHi que a los de pHe (Doering y col., 1996).

Una de las limitantes experimentales más serias para estudiar el papel fisiológico del intercambiador en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en distintos tipos celulares, es la falta de bloqueadores específicos. En células intactas se han utilizado varios iones tri y divalentes para inhibir el intercambiador. En músculo cardíaco el orden de potencia de la inhibición es: $\text{Ln}^{+3} > \text{Nd}^{+3} > \text{Tm}^{+3} = \text{Y}^{+3} > \text{Cd}^{2+}$. El Ni^{2+} también bloquea el intercambiador, aunque a altas concentraciones. Algunos derivados de la amilorida bloquean al intercambiador con alta eficiencia pero estos compuestos no son específicos, teniendo efectos sobre canales de Na^+ y de Ca^{2+} de tipo T.

Se ha reportado que el DCB es un inhibidor relativamente específico para el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Un péptido denominado XIP (Dipolo y Beauge, 1994) es más específico pero debe inyectarse intracelularmente para tener efecto.

El potencial de reposo de las células espermatoogénicas se ha estimado en alrededor de -30 mV (-22 mV, según Reyes y col., 1994). El potencial de equilibrio del intercambiador en células espermatoogénicas no se conoce, sin embargo dado que las células espermatoogénicas mantienen bajas $[Ca^{2+}]_i$ por largo tiempo, es razonable suponer que el potencial de reposo de estas células es más negativo que el potencial de equilibrio del intercambiador. Los siguientes datos harían pensar en el intercambiador como posible responsable de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la alcalinización intracelular:

- a) El intercambiador se activa por la alcalinización intracelular
- b) El intercambiador puede transportar tanto Sr^{2+} como Ba^{2+} (Tibbits y Philipson, 1985; Condrescu y col., 1997).
- c) El Ni^{2+} , en el rango milimolar, inhibe al intercambiador, en tanto que la nifedipina no tiene efecto sobre el mismo (Trospen y Philipson, 1983).
- d) La monensina estimula el modo reverso de operación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} aumentando la $[Na^+]_i$ (Santi y col., 1995).

A pesar de estas similitudes, la entrada de Ca^{2+} inducida por la alcalinización intracelular difiere de la producida por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} en varios aspectos cruciales:

- a) El primero permite el pasaje de Mn^{2+} mientras que el intercambiador no es capaz de transportar este catión divalente (Trospen y Philipson, 1983).
- b) Por otra parte, la perfusión de estas células con $10 \mu M$ DCB (ver resultados), no afecta los transitorios de Ca^{2+} inducidos por alcalinización intracelular.
- c) Finalmente, la ouabaína ($20 \mu M$), si bien produce un aumento de la $[Na^+]_i$ al igual que la monensina, no es capaz de aumentar el transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización.

Todos estos datos son inconsistentes con una participación significativa del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en el influjo de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular en células espermatoogénicas.

Posible papel de los canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de reservorios intracelulares.

Una de las áreas más activas en el estudio de la generación de señales mediadas por Ca^{2+} parte del descubrimiento de los canales que se activan por el vaciamiento de los reservorios intracelulares (Putney, 1990). Se ha demostrado, principalmente en células no excitables, que la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, inducida por varios mecanismos, es seguida de un influjo sostenido de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática conocido en inglés como “store operated influx” (SOCs) (Putney, 1986; 1997; revisión de Parekh y Penner, 1997).

Una característica importante de esta vía es que a pesar de que los reservorios sólo pueden liberar Ca^{2+} en forma transitoria, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se puede mantener a través de la entrada de Ca^{2+} por estos canales, también conocidos como canales capacitativos. Una evidencia directa de la existencia de este tipo de canales se obtuvo al registrarse electrofisiológicamente corrientes de Ca^{2+} activadas por la depleción de los reservorios intracelulares (ver revisión de Parekh y Penner, 1997). Utilizando la técnica de fijación de voltaje en célula completa, se ha demostrado la existencia de SOCs en numerosas células no excitables. A esta corriente se le denominó I_{CRAC} . La corriente I_{CRAC} puede activarse por una serie de maniobras que producen el vaciamiento de los reservorios intracelulares como: 1) inclusión de IP_3 en la solución de la pipeta de patch (Hoth, y Penner, 1992), 2) aplicación externa de ionóforos de Ca^{2+} como la ionomicina (Hoth y Penner, 1992) 3) exponer a los receptores membranales al agonista que induce aumentos en la $[\text{IP}_3]_i$ (Parekh y Penner, 1995). Existen otros métodos pasivos que se basan en la pérdida endógena de Ca^{2+} de los reservorios e impiden su relleno, como: 4) dializar el citoplasma con altas concentraciones de agentes quelantes de Ca^{2+} como EGTA o BAPTA, (Hoth y Penner, 1992; Hoth y Penner, 1993; Zweifach y Lewis, 1995) 5) aplicar inhibidores de la de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) como la taspigargina (Premack y col., 1994; Parekh y Penner, 1996).

La corriente I_{CRAC} es independiente del voltaje en el sentido de que no se activa por el potencial. Sin embargo una vez que dicha corriente se activa presenta una curva I-V característica que muestra una gran rectificación para potenciales negativos y un potencial de reversión más positivo que +50 mV. Esta corriente es muy selectiva para Ca^{2+} con respecto a los cationes monovalentes (Hoth y Penner, 1993; Yao y Tsien, 1997). Si bien

I_{CRAC} fue la primera corriente reportada activada por el vaciamiento de reservorios intracelulares, se han encontrado otras corrientes activadas por el mismo mecanismo en distintos tipos celulares, denominadas I_{SOC} . Aunque la secuencia de selectividad difiere un poco con la de los I_{CRAC} , ambas dejan pasar otros divalentes además de Ca^{2+} , como Ba^{2+} y Sr^{2+} (Hoth y Penner, 1993; Yao y Tsien, 1997). Aún se desconoce la señal que emana del vaciamiento de los reservorios y que activa la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Se han propuesto varios candidatos que van desde un acoplamiento directo entre los reservorios y la vía de influjo hasta diferentes segundos mensajeros. El mecanismo por el cual el vaciamiento de los reservorios activa estos canales de Ca^{2+} sigue siendo aún un misterio. Se requieren por lo menos 2 cosas: una molécula capaz de detectar el contenido de los reservorios y una señal que transmita esta información a los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. (para más detalles, ver la revisión de Pareckh y Penner, 1997).

En algunos tipos celulares existe otra vía de entrada de Ca^{2+} diferente a las corrientes I_{CRAC} e I_{SOC} (Putney, 1997) que podría corresponder a receptores de IP_3 presentes en la membrana plasmática (Vaca y Kunze, 1995). La corriente acarreada por estos posibles receptores de IP_3 membranales también se bloquea con Ni^{2+} y Cd^{2+} (Premack y col., 1994; Zweifach y Lewis, 1997).

En cuanto al papel fisiológico que desempeñan estos canales, uno obvio sería el contribuir al relleno de los reservorios intracelulares (Pareckh y col., 1993). A pesar de que muchas células son muy eficientes en el reciclamiento del Ca^{2+} que se libera al espacio intracelular, otros tipos celulares requieren un influjo de Ca^{2+} para rellenar sus reservorios, dado que la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática saca la mayor parte del Ca^{2+} liberado por los reservorios. En muchas células no excitables el Ca^{2+} citosólico es importante para la regulación del proceso de exocitosis. En los mastocitos, I_{CRAC} constituye la fuente principal de Ca^{2+} que ayuda a mantener elevada la $[Ca^{2+}]_i$ luego de la estimulación del receptor (Fasolato y col., 1993). Otra función de estos canales es la activación de adenilato ciclasas que se encuentran colocalizadas con estos canales de entrada de Ca^{2+} y en donde el influjo de Ca^{2+} , induce la producción rápida de AMPc (Fagan y col., 1996).

Se ha propuesto un papel para estos canales en el control del ciclo celular y la proliferación. La mayoría de las células de un sistema multicelular se encuentran en un estado quiescente denominado G_0 . Luego de la estimulación con mitógenos y/o factores de crecimiento las células continúan el ciclo que culmina en la mitosis. Existen dos etapas críticas en este ciclo que son G_1/S que precede la síntesis de ADN y la fase G_2/M . Al parecer la liberación del Ca^{2+} almacenado, inducido por IP_3 es importante en la entrada a estas fases (Berridge, 1995). La participación del influjo de Ca^{2+} en estos casos no está completamente claro.

Existen también otras vías de entrada de Ca^{2+} que no son dependientes del voltaje, ni activadas por depleción de los reservorios, y que pueden coexistir en la misma célula con los canales SOC. Por ejemplo, en los linfocitos T Jurkat se ha descrito una vía de entrada de Ca^{2+} activada directamente por el IP_3 (Kuno y Gardner, 1987) y cuya secuencia de selectividad para divalentes es: $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$. El Ln^{3+} y Cd^{2+} pueden usarse como bloqueadores inespecíficos de los receptores de IP_3 . Esta vía de influjo de Ca^{2+} se ha reportado también en células endoteliales A431 (Mozhayeva y col., 1990) y en neuronas olfatorias (Fadool y Ache, 1994).

Tanto los I_{CRAC} como los receptores de IP_3 permiten el pasaje de Mn^{2+} (Fasolato y col., 1993; Hoth y Penner, 1993; Premack y col., 1994; Zweifach y Lewis, 1993). Es de destacar también que el pH es un modulador importante de estas vías de entrada de Ca^{2+} . En la línea celular A7r5 de músculo liso de rata, la alcalinización extracelular potencia la entrada de Ca^{2+} capacitativa (Iwasawa y col., 1997; Tsukioka y col., 1994).

Las propiedades de estas vías de entrada de Ca^{2+} poseen algunas semejanzas con la vía de entrada de Ca^{2+} activada por alcalinización intracelular en las células espermatogénicas:

- a) Tanto I_{CRAC} como I_{SOC} , aunque muy selectivos para el Ca^{2+} , también permiten el pasaje de otros cationes divalentes como Ba^{2+} y Sr^{2+} (Hoth y Penner, 1993; Yao y Tsien, 1997).
- b) El Ni^{2+} y el Cd^{2+} bloquean estas corrientes (Premack y col., 1994; Zweifach y Lewis, 1993; Yao y Tsien, 1997).

- c) La vía de permeación activada por IP_3 en los linfocitos T Jurkat tiene la siguiente secuencia de selectividad: $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$, y el Ln^{3+} y Cd^{2+} se han propuesto como bloqueadores inespecíficos de estas vías activadas por IP_3 .
- d) Tanto los I_{CRAC} como los receptores de IP_3 aunque selectivos para Ca^{2+} , también permiten el pasaje de Mn^{2+} (Fasolato y col., 1993; Hoth y Penner, 1993; Premack y col., 1994; Zweifach y Lewis, 1993).
- e) Es de destacar que el pH es un importante modulador de ambos mecanismos (Tsukioka y col., 1994; Iwasawa y col., 1997).

Como se mencionó anteriormente, la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares no parece contribuir directamente en forma significativa en la generación del transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular en las células espermatogénicas. Esto probablemente se deba a que en estas células los reservorios de Ca^{2+} no son muy abundantes. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que la alcalinización intracelular induzca la depleción de los reservorios permitiendo así la apertura de los SOCs. Dado que el pH_i regula la actividad de esta vía de flujo de Ca^{2+} , es razonable suponer que pueda participar, o sea la responsable del transitorio de Ca^{2+} inducido por alcalinización intracelular. Los experimentos que se muestran en la fig. 36 son consistentes con la presencia de canales activados por vaciamiento de reservorios en las células espermatogénicas. Queda por determinarse si estos SOCs son los responsables de la entrada de Ca^{2+} inducida por alcalinización.

Otra posibilidad es que esta vía de entrada de Ca^{2+} sea un nuevo canal regulado por pH, como es el caso del $mSlo3$, un nuevo canal de K^+ activado por pH que se expresa en células espermatogénicas de mamífero y que es regulado tanto por el potencial de membrana como por el pH_i (Schreiber y col., 1998).

Possible papel fisiológico de la vía de flujo de Ca^{2+} acoplada a la alcalinización intracelular.

En muchos tipos celulares la alcalinización intracelular puede producir aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$. En este sentido, los cambios de pH_i pueden afectar el proceso de

diferenciación modulando la $[Ca^{2+}]_i$. Algunos aspectos de la proliferación y maduración de las células espermatogénicas son sensibles al pH_i (Moolenaar, 1986; Boron, 1986). A su vez, los cambios de pH_i modulan la motilidad de los espermatozoides de diferentes especies (Shapiro y col., 1990; Darszon y col., 1996), son necesarios para el proceso de capacitación de los espermatozoides de mamífero (Meizel y Deamer, 1978; Working y Meizel, 1983; Vredenburg y Parrish, 1995; Zeng y col., 1996), y están involucrados en la RA de una diversidad de organismos (ver revisión de Darszon y col., 1996).

Nuestros resultados sugieren que esta vía de entrada de Ca^{2+} regulada por pH_i podría tener una participación tanto en la espermatogénesis como en la fisiología del espermatozoide.

Posible papel fisiológico de la vía de influjo de Ca^{2+} acoplada a la alcalinización intracelular en el espermatozoide maduro

1) En la capacitación

Como mostramos en los resultados, los espermatozoides testiculares pueden experimentar grandes incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la alcalinización intracelular por NH_4Cl . Por lo tanto, es razonable suponer que esta vía de entrada de Ca^{2+} puede ser importante en la fisiología del espermatozoide. En su viaje desde los túbulos seminíferos hasta el oviducto, los espermatozoides se encuentran con diferentes condiciones ambientales. Entre éstas, los cambios en las concentraciones iónicas y en el pH_e influyen en el estado fisiológico y en la supervivencia de los espermatozoides, de tal forma que aquellos que son más aptos para la reproducción se van seleccionando y madurando (Harper, 1988; Setchell y Brooks, 1988). En este sentido, tanto la vía de entrada de Ca^{2+} sensible a pH_i descrita en este trabajo, como los canales de Ca^{2+} de tipo T (los cuales también son sensibles al pH_e) podrían influir en la función de los espermatozoides a lo largo de su tortuoso camino hacia el óvulo.

Como se mencionó en la introducción, para ser capaces de fertilizar al óvulo, los espermatozoides deben sufrir un proceso denominado capacitación, proceso que involucra

una serie de modificaciones biofísicas y estructurales no muy bien comprendidas (ver introducción) (Florman y Babcock, 1991; Baldi y col., 1996). La alcalinización intracelular de un $\text{pH} \cong 6.5$ a 6.7 es un paso obligatorio durante la capacitación *in vitro* (Parrish y col., 1989; Zeng y col., 1996; Baldi y col., 1996). Curiosamente, como se reporta en este trabajo, éste es el mismo rango de cambio de pH requerido para que las células espermatogénicas respondan a la alcalinización intracelular con aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Podría especularse que el umbral de pH_i , así como el fenómeno de facilitación aquí reportados, son relevantes para el proceso de capacitación al permitir a los espermatozoides responder más vigorosamente a los cambios de pH luego de varios episodios de alcalinización intracelular.

2) En la Reacción Acrosomal.

Aunque existen diversos modelos para explicar la Reacción Acrosomal, el orden preciso de los eventos involucrados y la identidad molecular de todos los participantes dista mucho de estar completamente aclarado.

Al igual que en el erizo de mar, se ha propuesto que por lo menos dos canales de Ca^{2+} diferentes participan en la RA del espermatozoide de mamífero (Florman, 1994, Tiwari-Woodruff y col., 1995). En el trabajo de Arnoult y col., se propone que un canal catiónico que permite la entrada de Ca^{2+} , depolariza al espermatozoide, permitiendo así la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T, cuya presencia en los espermatozoides puede suponerse (Liévano y col., 1996; Santi y col., 1996; Arnoult y col., 1996b). Este aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunado al incremento del pH_i dispararían la RA. Un problema serio que presenta este modelo, es que la activación de los canales de Ca^{2+} tipo T es transitoria, lo cual no permite explicar el aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados con la RA. Esta limitación, no desaparece con la alcalinización intracelular, ya que como se mostró antes, ésta no modifica drásticamente las características biofísicas de estos canales. Por otra parte, debe enfatizarse que la vía de entrada de Ca^{2+} activada por alcalinización intracelular, reportada por primera vez en este trabajo, parecería más apropiada para producir los aumentos sostenidos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A partir de esta nueva información, el

modelo deberá ser modificado en dos aspectos cruciales: la pobre participación de los canales T en el influjo sostenido de Ca^{2+} y la participación de una nueva vía de influjo de Ca^{2+} regulada por el pH intracelular. Esta nueva vía de entrada de Ca^{2+} podría ser la responsable del influjo de Ca^{2+} insensible a DHP que se ha reportado en los espermatozoides.

Parte B: Canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje en las células espermatogénicas.

El influjo transmembranal de Ca^{2+} que resulta de la apertura de los CCVD desempeña un papel muy importante en diversas funciones celulares. Los canales de Ca^{2+} nativos responsables de este transporte iónico se clasifican de acuerdo a criterios farmacológicos y electrofisiológicos en tipos L, N, P/Q, y T.

Los canales de tipo T tienen un bajo umbral de activación, se activan a potenciales más negativos que -40 mV, presentan una conductancia unitaria pequeña, se inactivan rápidamente (pocas decenas de milisegundos luego del pulso depolarizante) y se deactivan lentamente. Por otra parte a potenciales de membrana de reposo más positivos que -50 mV, los canales de bajo umbral están inactivados mientras que los de alto umbral no sufren inactivación apreciable hasta que el potencial de reposo es más positivo que -30 mV. La permeabilidad iónica también difiere entre los dos grupos de canales. En general los canales de tipo T son igualmente permeables al Ba^{2+} y al Ca^{2+} , mientras que los canales de alto umbral dejan pasar con más facilidad Ba^{2+} que Ca^{2+} . De momento, no existen bloqueadores específicos para los canales T. Los bloqueadores más comunmente empleados para los canales T son el Ni^{2+} y la amilorida, si bien se ha demostrado que también afectan otras vías de movilización de Ca^{2+} . Los canales de alto umbral L, N, P/Q se activan a potenciales más positivos, tienen una conductancia unitaria mayor, en general se inactivan más lentamente y se deactivan más rápidamente que los T. También se bloquean más fácilmente por Cd^{2+} que los canales T. Los canales de alto umbral de activación pueden distinguirse entre sí en base a su sensibilidad a distintos agentes farmacológicos. Los canales de tipo L son muy sensibles a DHP (agonistas y

antagonistas). Los de tipo N se bloquean por la toxina aislada del *Conus geographus*, ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx). Los de tipo P/Q se bloquean por el veneno de araña *Agelenopsis aperta*.

Desde el punto de vista bioquímico los canales de Ca^{2+} neuronales son complejos multiméricos formados por distintas subunidades denominadas α_1 , $\alpha_2\delta$, β . La subunidad α_1 actúa como sensor de voltaje y a su vez forma el poro del canal. También es el blanco de múltiples agentes farmacológicos. La subunidad α_1 (170-240 kD) se compone de 4 dominios repetidos (I-IV), cada uno de los cuales a su vez estaría formado por 6 segmentos putativos transmembranales (S1-S6) y la región del poro (P) entre los segmentos S5 y S6. Hasta ahora se han identificado 8 genes diferentes que codifican para las distintas α_1 desde α_{1A} hasta α_{1H} , que cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus* o en células de mamífero dan lugar a corrientes con propiedades cinéticas y farmacológicas similares a las de los diferentes canales nativos (ver tabla). La subunidad $\alpha_2\delta$ (140-170 kD), anclada a la membrana a través de un dominio extracelular altamente glicosilado, está compuesta por dos péptidos unidos por puentes disulfuro codificados por el mismo gen. La subunidad β es enteramente citoplasmática y tiene un peso molecular de 52-78 kD. Existen 4 subunidades β (β_1 - β_4). El canal tipo L del músculo esquelético presenta además una subunidad γ de 32 kD compuesta por 4 segmentos transmembranales. Las propiedades del canal son moduladas por estas subunidades auxiliares de lo que resulta una enorme variedad funcional y estructural de los CCVD (Gurnett y Campbell, 1996; Snutch y Reiner, 1992; Mc Cleskey, 1994; Tsien y col., 1991).

subunidad	ω -CTX GVIA	DHPs	cadmio	ω -AG IVA	ω -CTX MVIIC	Tipo
α_{1A}	-	-	+	+	+	P/Q
α_{1B}	+	-	+	-	+	N
α_{1C}	-	+	+	-	-	L
α_{1D}	-	+	+	-	-	L
α_{1E}	-	-	+	-	-	T?
α_{1G}	-		+			T

Utilizando la técnica de fijación de voltaje en célula completa nosotros encontramos que las células espermatogénicas aisladas del testículo de ratón adulto expresan CCVD con las siguientes características:

Se trata de canales de bajo umbral de activación, dado que se activan a potenciales bastante negativos (alrededor de -60 mV). Estos canales se inactivan rápidamente, y tanto la inactivación como la activación son fuertemente voltaje-dependientes. Los canales son igualmente permeables a Ca^{2+} y a Ba^{2+} , deactivándose lentamente y bloqueándose con Ni^{2+} y con amilorida. Todas estas características apuntan a que los CCVD de las células espermatogénicas pertenecen a la familia de los canales de Ca^{2+} denominados de tipo T.

De manera muy interesante, en estas células no encontramos un componente de la corriente de Ca^{2+} que se active a potenciales más depolarizados y además el curso temporal de la deactivación a todos los potenciales explorados fue monoexponencial. Ambos hallazgos indican que estas células solamente expresan una única población de CCVD del tipo T. En un trabajo publicado un poco después que el de nuestro grupo, Arnoult y col. (1996) también reportaron la presencia de canales de Ca^{2+} de tipo T en las células espermatogénicas del ratón.

Los experimentos de biología molecular en poblaciones purificadas de células espermatogénicas arrojaron resultados que concuerdan con los resultados obtenidos por la electrofisiología (Liévano y col., 1996). Como una primera aproximación para establecer la identidad molecular de los canales de Ca^{2+} presentes en las células espermatogénicas Arturo Liévano llevó a cabo experimentos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos contra las subunidades α_{1A} - α_{1E} en cADN de testículo de ratón. Se obtuvieron así amplímeros del tamaño esperado para todos los oligos explorados. Estos experimentos muestran que todas las subunidades α_1 se expresan en el testículo. Este hallazgo no es sorprendente, dado que en testículo existen diferentes tipos celulares además de las células espermatogénicas (células sanguíneas, linfáticas, fibroblastos, fibras nerviosas, músculo liso vascular, etc). Sin embargo cuando se utilizaron poblaciones puras de células espermatogénicas en distintas etapas de maduración (espermatocitos en paquiteno, espermátides redondas, espermátides condensantes), se detectó mayoritariamente la

expresión de la subunidad α_{1E} (confirmado por secuenciación). También, aunque menos intensa se obtuvo señal para α_{1A} . Datos recientes (Serrano y col., no publicados) indican que el ARNm para α_{1C} también está presente en estas células pero en cantidades muy pequeñas, mucho menores que α_{1A} . Es de destacar que las subunidades α_{1C} y D , las cuales codifican para el canal de Ca^{2+} de tipo L no se expresan predominantemente en estas células, lo cual concuerda con los resultados electrofisiológicos descritos en esta tesis.

La identidad molecular de algunos subtipos de canales T es aún controversial. Soong y col. (1993) mostraron que la subunidad α_{1E} de cerebro de rata expresada en ovocitos exhibe propiedades funcionales compatibles con los canales T. Sin embargo, cuando se expresaron los cADN de α_{1E} de conejo y humano en sistemas heterólogos, únicamente se observaron canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación. Empleando antisentidos contra la subunidad α_{1E} de cerebro de rata y sus homólogos atriales Piedras-Renterías y col. observaron una disminución de las corrientes T en miocitos atriales en cultivo por lo que concluyeron que el homólogo atrial de α_{1E} podría codificar los canales T cardíacos (Piedras-Renterías y col., 1997). Recientemente Pérez-Reyes y col. (1998) clonaron de una librería de cerebro de rata un canal denominado α_{1G} que al expresarse en ovocitos de *Xenopus* presenta muchas de las características de un canal de Ca^{2+} de tipo T. La subunidad α_{1G} está presente en ratón y humano pero no se expresa en testículo. En este artículo los autores proponen que α_{1G} representa el primer miembro de una familia putativa de canales de Ca^{2+} T. Estos datos contradicen la idea de que la subunidad α_{1E} contribuye a la formación de canales T. No obstante en otro trabajo publicado recientemente, Meir y Dolphin (1998) demuestran que la expresión de las subunidades α_{1B} , α_{1E} o α_{1C} en células COS7 (línea celular que no posee canales de Ca^{2+} endógenos), puede producir canales de Ca^{2+} de bajo umbral de activación y con cinéticas de activación e inactivación prácticamente indistinguibles de las de los canales de Ca^{2+} nativos de tipo T. De acuerdo a estos hallazgos, y en ausencia de evidencias que demuestren lo contrario, es razonable suponer que la subunidad α_{1E} presente en células espermatogénicas codifica el canal T, aunque también podría tratarse de una isoforma aún desconocida de la nueva familia de canales cuyo primer miembro es el canal α_{1G} .

Posible participación de los CCVD en la Reacción Acrosomal.

Las características de los canales de Ca^{2+} presentes en células espermatozoides son similares a las reportadas para los canales de tipo T de las células somáticas. Los canales de Ca^{2+} de tipo T están presentes en una variedad de células excitables, incluyendo neuronas, músculo esquelético, cardíaco y liso, células endocrinas y neuroendocrinas (Herrington y Lingle, 1992; Tsien, y col., 1995; Bean, 1989; Tsien y Tsien, 1990).

En las neuronas reticulares talámicas, estos canales participan en la generación de actividad eléctrica rítmica y oscilatoria (Huguenard, 1996), así como en las corrientes marcapaso cardíacas (McDonald, 1994). Su posible papel fisiológico en células no excitables es menos claro. Existen evidencias que indican que estos canales participan en la secreción de las células somáticas. Por ejemplo, acoplado la depolarización inducida por hormona corticotropa a la producción de hormonas en células de glándula suprarrenal (Enyeart y col., 1993; Rossier y col., 1993). Las corrientes T que se expresan en las células de Leydig (Kawa, 1987) podrían cumplir un papel similar.

Como se mencionó en la introducción, numerosas evidencias sugieren la participación de CCVD en la RA del espermatozoides de mamífero. La inhibición por DHPs tanto del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como de la RA inducidos por ZP3 hacen pensar en la participación de canales de Ca^{2+} de tipo L. Sin embargo, los experimentos electrofisiológicos descritos en esta tesis mostraron claramente que los CCVD de alto umbral están ausentes en las células espermatozoides. Esto nos llevó a examinar los efectos de las DHPs sobre las corrientes de Ca^{2+} de las células espermatozoides. Encontramos que la nifedipina inhibe la corriente de Ca^{2+} con un $\text{IC}_{50} = 8.1 \mu\text{M}$ (rango de concentración similar al que inhibe la RA). En acuerdo con nuestro trabajo, Arnoult y cols. también encontraron que la DHP PN200-110 inhibe las corrientes de Ca^{2+} de estas mismas células con un $\text{IC}_{50} = 39 \text{ nM}$. (Arnoult y col., 1996). Estos resultados son importantes, dado que en caso de que el canal T esté presente y cumpla una función importante en el espermatozoide, su inhibición por dihidropiridinas podría explicar los

efectos anticonceptivos reportados en humano de las DHP administradas crónicamente como terapia cardiovascular (Bennof y col., 1994).

El efecto de las DHPs sobre los canales de Ca^{2+} del tipo T no es inédito. En estudios previos, se ha mostrado el bloqueo por dosis micromolares de DHPs de canales de Ca^{2+} de tipo T presentes en ciertos tipos celulares (Akaike y col., 1989; Enyeart y col., 1993; Romanin y col., 1992). El agonista de canales de Ca^{2+} BayK 8644 no tiene ningún efecto sobre las corrientes T de las células espermatogénicas.

De estar presentes en el espermatozoide maduro, los canales de Ca^{2+} tipo T podrían ser los que activa la ZP. Estos canales de Ca^{2+} poseen todas las características del influjo de Ca^{2+} activado por la ZP en espermatozoides de mamífero, incluyendo aquellas que son inconsistentes con la presencia de canales de Ca^{2+} tipo L. Las IC_{50} para PN200-110, Ni^{2+} y Cd^{2+} requeridas para bloquear los canales tipo T son similares a las que se necesitan para inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por la ZP (Arnoult y col., 1996). A su vez, ninguno de estos mecanismos se afecta por el agonista de canales L BayK 8644.

Tanto la activación del influjo de Ca^{2+} por la ZP como la RA se inhiben por pimozina y amilorida (Arnoult y col., 1996). Ambas drogas son antagonistas de los canales de Ca^{2+} tipo T (Tsien y col., 1988; Tang y col., 1988) y bloquean efectivamente las corrientes T de las células espermatogénicas (este trabajo; véase también Arnoult y col., 1996).

Por otra parte, los estudios electrofisiológicos muestran que las células espermatogénicas expresan un solo tipo de canal de Ca^{2+} con las características biofísicas de un canal de Ca^{2+} tipo T, destacándose la ausencia de canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación, como los de tipo L.

Todas estas observaciones sugieren fuertemente que los canales T, de estar presentes en el espermatozoide maduro, pudieran ser responsables, al menos en parte, del influjo de Ca^{2+} producido por la ZP y que es necesario para que ocurra la RA.

Nuestro trabajo muestra que en el espermatozoide, estas corrientes podrían tener un papel relevante en el proceso excitotósico acrosomal. Durante el proceso de capacitación de los espermatozoides se produce una hiperpolarización desde aproximadamente -30 a -60 mV probablemente por un aumento de la permeabilidad de

estas células al ion K^+ (Zeng y col, 1995). Puede especularse que esta hiperpolarización removería significativamente la inactivación por voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo T, posibilitando su apertura en respuesta a la despolarización inducida por ZP3, iniciándose así la RA. El mecanismo a través del cual la ZP depolariza a los espermatozoides sigue sin aclararse completamente. Se ha reportado que la ZP o ZP3 depolariza espermatozoides de toro y ratón en 30 mV activando un canal catiónico no selectivo, (Arnoult y col., 1996). Experimentos en bicapas lipídicas (Cox y Paterson, 1989; Cox y col., 1991), Labarca y col., 1995) y mediante la técnica de patch clamp (Espinosa y col., 1997), revelaron la presencia de canales catiónicos pobremente selectivos en los espermatozoides de mamífero, los que podrían ser responsables de la depolarización inducida por la ZP3. Por otra parte recientemente se clonó un canal de K^+ activado por el aumento de pHi denominado mSlo3, el cual se expresa únicamente en células espermatogénicas (Schreiber y col., 1998). De estar presente también en el espermatozoide, este canal, dada su baja selectividad por K^+ ($P_{K^+}/P_{Na^+} = 5$), podría depolarizarlos, activando así los CCVD tipo T. Un argumento en contra de esta hipótesis es que los aumentos de pHi inducidos por ZP3 se inhiben por Ptx mientras que la depolarización no se ve afectada por esta toxina (Arnoult y col., 1996).

La función específica del influjo de Ca^{2+} mediado por los CCVD en la vía de transducción iniciada por la ZP queda aún por esclarecerse. Los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ producidos por la ZP necesarios para que se produzca la RA son sostenidos (Arnoult y col., 1996; Florman, 1994; Florman col., 1989). Sin embargo es de esperarse que los canales T solamente produzcan flujos pequeños y transitorios de Ca^{2+} debido a su rápida inactivación. Como se muestra en los resultados, las alcalinizaciones intra y extracelulares no modifican las cinéticas de activación e inactivación de la corriente de Ca^{2+} T en estas células. Si bien producen un aumento significativo de la densidad de corriente, creemos que éste no es lo suficientemente grande como para explicar un aumento sostenido en la $[Ca^{2+}]_i$.

Por lo tanto pensamos que si bien este canal de Ca^{2+} puede tener una participación en la RA, no sería el único responsable del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la ZP3. Al igual que en el erizo de mar, más de un tipo de canales de Ca^{2+} participan en la inducción

de la RA de los espermatozoides de mamífero (Guerrero y Darszon, 1989; Florman, 1994). La vía de influjo activada por el aumento de pH_i descrita en las células espermatogénicas podría corresponder a la otra vía de entrada de Ca²⁺, insensible a DHPs, que participa en la RA y que está conectada a la activación de los canales de Ca²⁺ tipo T. Interesantemente, utilizando bicapas lipídicas, Labarca y col. han encontrado un canal de Ca²⁺ de alta conductancia, pobremente selectivo similar al descrito en erizo de mar y que se bloquea con Ni²⁺ y rojo de rutenio. Este canal podría ser también el responsable de un aumento sostenido de la [Ca²⁺]_i dado que a ciertos potenciales de membrana permanece abierto, (Beltrán y col, 1994; Labarca y col, resultados no publicados).

Otra posibilidad, sugerida por Arnoult y col., es que el Ca²⁺ que entra por el canal de Ca²⁺ tipo T induzca la liberación de Ca²⁺ de reservorios intracelulares, en este caso del acrosoma (en el cual se ha reportado la presencia de receptores de IP₃ y así como salida de Ca²⁺ sensible a IP₃ a través de los mismos, Walensky y Snyder, 1995). La alcalinización intracelular favorecería este mecanismo de acción (Berridge, 1993). Según el modelo adelantado por Arnoult y col. los canales T dispararían una entrada de Ca²⁺ necesaria para luego producir elevaciones sostenidas de la [Ca²⁺]_i y en consecuencia, la RA. Otras respuestas a la zona pelúcida como el aumento de pH_i (Arnoult y col., 1996; Florman y col., 1989) y la producción de IP₃ (Tomes y col., 1996) podrían actuar en forma concertada con los canales T para regular la liberación de Ca²⁺ desde estos reservorios intracelulares, pero la contribución de los canales T sería esencial para este mecanismo. Estos autores proponen que dichas observaciones están de acuerdo con sus resultados previos donde la depolarización de la membrana del espermatozoide y los aumentos de pH_i causados por ZP3 actuarían en forma sinérgica para producir aumentos sostenidos de la [Ca²⁺]_i (Arnoult y col., 1996).

Posible participación de los canales de Ca²⁺ tipo T en los procesos de diferenciación y maduración de las células espermatogénicas

Numerosas evidencias indican que los canales de Ca²⁺ de tipo T participan en el desarrollo de algunos tipos celulares (Bean, 1989). Estos canales son responsables de

depolarizaciones espontáneas en neuronas inmaduras, disparando aumentos espontáneos de la $[Ca^{2+}]_i$, que determinan diferentes aspectos de la diferenciación neuronal en *Xenopus* (Gu y Spitzer, 1993; 1995). Al parecer los canales T también están involucrados en la diferenciación y proliferación celular. Por ejemplo, la diferenciación de las células del estroma de la médula ósea inducida por dexametasona involucra la expresión de corrientes de Ca^{2+} tipo T (Puvlicober col., 1994). Asimismo la inhibición farmacológica de los canales de Ca^{2+} de tipo T en fibroblastos de ratón suprime tanto el influjo de Ca^{2+} como la proliferación celular inducida por factor de crecimiento plaquetario (Wang y col., 1993).

Los espermatoцитos primarios permanecen en la etapa de paquiteno aproximadamente durante una semana, al término de la cual llevan a cabo dos divisiones meióticas sucesivas para producir espermatoцитos secundarios y espermátides redondas haploides. Los espermatoцитos en paquiteno representan la etapa más activa transcripcionalmente en el desarrollo de las células germinales masculinas (Cebra-Thomas y Silver, 1991). En esta etapa de diferenciación, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo T podría constituir la señal para el desarrollo de las células germinales masculinas. En este sentido, es importante mencionar que encontramos que la densidad de la corriente de Ca^{2+} de las células espermatogénicas aumenta significativamente cerca de la pubertad en el ratón, alcanzando los valores máximos luego de la maduración sexual. Esta regulación funcional asociada con la diferenciación es consistente con la hipótesis arriba mencionada.

Por otro lado, se ha sugerido que la inactivación persistente de los canales tipo T por el potencial de membrana podría servir para mantener bajos los niveles de Ca^{2+} intracelular. Los niveles bajos de Ca^{2+} constituirían una señal para mantener las células en un estado metabólico quiescente (Reyes y col., 1994).

Como se presentó en la sección de resultados, los espermatoцитos en paquiteno son las células que presentan las $[Ca^{2+}]_i$ más bajas dentro de la población de células espermatogénicas obtenidas del testículo de ratón adulto (alrededor de 50 nM). Estos bajos niveles de Ca^{2+} intracelular se mantienen sin cambios durante períodos de observación mayores de 30 minutos, lo cual indica que los canales de Ca^{2+} tienen un nivel bajo de activación espontánea bajo nuestras condiciones de registro. Nosotros también

encontramos que los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan gradualmente a medida que se las células pasan por estadios de maduración cada vez más avanzados.

VI CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra que en las células espermatozógenicas de animales adultos existen dos vías independientes de entrada de Ca^{2+} .

La primera de estas vías posee las características de un canal selectivo para Ca^{2+} cuya actividad se modula por el pH. Este canal permite el pasaje de otros cationes divalentes, se bloquea con Cd^{2+} y Ni^{2+} y no con DHP. Además, esta vía presenta un fenómeno de potenciación uso dependiente, experimenta una regulación funcional durante el desarrollo, misma que determina aumentos cada vez mayores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a medida que las células atraviesan por etapas cada vez más avanzadas de maduración. En este estudio inicial no hemos sido capaces de identificar con certeza al mecanismo responsable de esta vía, aunque prácticamente hemos descartado a los CCVD, al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y a reservorios intracelulares de Ca^{2+} como responsables directos, quedando por confirmarse si se trata de un canal de Ca^{2+} activado por el vaciamiento de reservorios intracelulares.

Por otra parte, hemos identificado a los CCVD presentes en estas células como pertenecientes a la familia de los canales de tipo T, siendo los únicos canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje presentes en estas células. Estos canales son bloqueados por DHP en el rango de concentración micromolar.

Ambas vías de entrada de Ca^{2+} podrían desempeñar una función importante en los procesos de proliferación y maduración de las células espermatozógenicas. Además, de estar presentes en los espermatozoides maduros, podrían participar de manera relevante en los procesos de capacitación y en la iniciación de la Reacción Acrosomal.

VII PERSPECTIVAS

Este trabajo muestra por primera vez la existencia de al menos dos vías de entrada de Ca^{2+} en las células espermatogénicas, una de las cuales es modulada por el pH_i . Esto abre la posibilidad de futuros estudios relacionados con dichas vías.

En primer lugar quedaría por identificar con certeza el mecanismo responsable de esta vía de influjo de Ca^{2+} . En este sentido dado que uno de los candidatos probables son los canales activados por el vaciamiento de los reservorios intracelulares, sería interesante confirmar la presencia de corrientes I_{SOC} asociadas al vaciamiento de dichos reservorios en estas células, y estudiar su modulación por el pH_i .

Otro hallazgo interesante es la facilitación que presenta esta vía de entrada de Ca^{2+} . Quedan por explorarse los mecanismos responsables de dicha facilitación.

En cuanto a los CCVD queda por estudiarse la modulación de dicho canales por otros factores como protein cinasas, calmodulina, etc y determinar la relación con la vía de entrada de Ca^{2+} inducida por alcalinización intracelular.

El esclarecimiento de estas interrogantes puede ser de gran importancia para entender los mecanismos que le permiten al espermatozoide fecundar al óvulo.

Properties of a Novel pH-dependent Ca^{2+} Permeation Pathway Present in Male Germ Cells with Possible Roles in Spermatogenesis and Mature Sperm Function

CELIA M. SANTI,*[†] TERESA SANTOS,* ARTURO HERNÁNDEZ-CRUZ,* and ALBERTO DARSZON*

From the *Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México City, D.F. 04510, México; and [†]Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

ABSTRACT Rises of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) are key signals for cell division, differentiation, and maturation. Similarly, they are likely to be important for the unique processes of meiosis and spermatogenesis, carried out exclusively by male germ cells. In addition, elevations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and intracellular pH (pH_i) in mature sperm trigger at least two events obligatory for fertilization: capacitation and acrosome reaction. Evidence implicates the activity of Ca^{2+} channels modulated by pH_i in the origin of these Ca^{2+} elevations, but their nature remains unexplored, in part because work in individual spermatozoa are hampered by formidable experimental difficulties. Recently, late spermatogenic cells have emerged as a model system for studying aspects relevant for sperm physiology, such as plasmalemmal ion fluxes. Here we describe the first study on the influence of controlled intracellular alkalinization on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on identified spermatogenic cells from mouse adult testes. In BCECF [(2',7')-bis(carboxymethyl)-(5,6)-carboxyfluorescein]-AM-loaded spermatogenic cells, a brief (30–60 s) application of 25 mM NH_4Cl increased pH_i by ~ 1.3 U from a resting pH_i ~ 6.65 . A steady pH_i plateau was maintained during NH_4Cl application, with little or no rebound acidification. In fura-2-AM-loaded cells, alkalinization induced a biphasic response composed of an initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop followed by a two- to threefold rise. Maneuvers that inhibit either Ca^{2+} influx or intracellular Ca^{2+} release demonstrated that the majority of the Ca^{2+} rise results from plasma membrane Ca^{2+} influx, although a small component likely to result from intracellular Ca^{2+} release was occasionally observed. Ca^{2+} transients potentiated with repeated NH_4Cl applications, gradually obliterating the initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop. The pH-sensitive Ca^{2+} permeation pathway allows the passage of other divalents (Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Mn^{2+}) and is blocked by inorganic Ca^{2+} channel blockers (Ni^{2+} and Cd^{2+}), but not by the organic blocker nifedipine. The magnitude of these Ca^{2+} transients increased as maturation advanced, with the largest responses being recorded in testicular sperm. By extrapolation, these findings suggest that the pH-dependent Ca^{2+} influx pathway could play significant roles in mature sperm physiology. Its pharmacology and ion selectivity suggests that it corresponds to an ion channel different from the voltage-gated T-type Ca^{2+} channel also present in spermatogenic cells. We postulate that the Ca^{2+} permeation pathway regulated by pH_i , if present in mature sperm, may be responsible for the dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} influx required for initiating the acrosome reaction and perhaps other important sperm functions.

KEY WORDS: calcium signaling • calcium entry • pH regulation • sperm physiology • spermatogenesis

INTRODUCTION

Spermatogenesis is a complex and highly coordinated process by which spermatogonia proliferate and differentiate to produce mature sperm. This unique process depends on the capacity of spermatogonia to undergo proliferation and to enter into a differentiation program that includes a meiotic cycle. There is ample evi-

dence indicating that elevations of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) are key signals for cell division, differentiation, and maturation of somatic cells. Thus, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may be important for spermatogenesis, although very little is known about its regulation in spermatogenic cells (reviewed in Jegou, 1993). An important step towards understanding germ cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulation was the demonstration that T-type Ca^{2+} channels constitute their only voltage-gated Ca^{2+} permeation pathway (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996). These channels, either alone or in combination with other Ca^{2+} signaling mechanisms, could play important roles in spermatogenesis (Santi et al., 1996).

Significantly more data exist in the role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations in mature sperm, although a universally accepted model has yet to be published. Changes in intra-

Drs. Hernández-Cruz and Darszon contributed equally to this article.

Portions of this work were previously published in abstract form (Santi, C.M., A. Darszon, and A. Hernández-Cruz. 1997. *Biophys. J.* 72: a34).

Address correspondence to Celia M. Santi, M.D., Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México City, D.F. 04510, P.O. Box 70-253, México. Fax: 525-622-56-07; E-mail: cgrau@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

cellular pH (pH_i) and $[Ca^{2+}]_i$ in mammalian sperm have been implicated in the control of capacitation and the acrosome reaction (AR),¹ a Ca^{2+} -dependent exocytotic event required for fertilization. Evidence suggests that a Ca^{2+} channel modulated by pH_i also participates in the sea urchin sperm AR (García-Soto et al., 1987; Guerrero and Darszon, 1989a). The nature of the membrane events of this activation pathway is not clear yet, nor is it well understood how internal alkalinization can induce the elevation of intracellular Ca^{2+} required for the physiological response (Florman et al., 1989; Florman, 1994; Arnoult et al., 1996a).

A close interrelationship between pH_i and $[Ca^{2+}]_i$ has been demonstrated in a variety of somatic cell types. In particular, cytosolic alkalinization modestly increases $[Ca^{2+}]_i$ in cultured smooth muscle cells (Siskind et al., 1989), endothelial cells (Danthuluri et al., 1990), HT₂₉ colon carcinoma cells (Benning et al., 1996; Nitschke et al., 1996), rat lachrymal acinar cells (Yodozawa et al., 1997), rat lymphocytes (Grinstein and Goetz, 1985), and several neuronal or neuroendocrine cell types (Dickens et al., 1990; Shorte et al., 1991).

The $[Ca^{2+}]_i$ changes induced when ZP3 (a glycoprotein of the egg's zona pellucida) binds to its receptor on the sperm membrane have been recorded in fura-2-loaded bovine and mouse sperm (Florman, 1994; Arnoult et al., 1996a). However, the minute volume of these cells makes reliable detection of fura-2 fluorescence difficult and electrophysiology very arduous (Darszon et al., 1996). Using mouse spermatogenic cells can circumvent some of these obstacles. Their large volume improves signal to noise ratio of fluorescence measurements. Also, recordings of ionic currents are much simpler than in sperm (Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996b), and it is possible to apply strategies of molecular biology to learn about their ion channel composition (Liévano et al., 1996). Late spermatogenic cells can be considered a suitable approximation to mature sperm since they possess many of the membrane proteins present in these transcriptionally inactive, terminal cells (Hetch, 1988).

This study was designed to evaluate the influence of changes in pH_i on $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis of spermatogenic cells from adult male mice. Our main goal was to determine if cytosolic alkalinization, elicited by the controlled exposure to a permeant weak base, induces changes in $[Ca^{2+}]_i$ and, if so, to understand the mechanism by which these changes occur. Furthermore, by taking advantage of the fact that cells from different stages of spermatogenesis and spermiogenesis can be readily identified, their individual responses to intracellular alkalinization were examined and compared.

¹Abbreviations used in this paper: AR, acrosome reaction; I-V, current to voltage; SOC, store operated channel.

Our results indicate that internal alkalinization consistently induces Ca^{2+} transients. Using maneuvers that inhibit plasmalemmal Ca^{2+} influx or Ca^{2+} release from internal stores, we concluded that the majority of Ca^{2+} rise results from plasmalemmal Ca^{2+} influx, although a small component that could be attributed to intracellular Ca^{2+} release was occasionally observed. The alkalinization-induced Ca^{2+} permeation pathway allows the passage of other divalents such as Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Mn^{2+} . In addition, the inorganic Ca^{2+} channel blockers Ni^{2+} and Cd^{2+} block this Ca^{2+} influx pathway, but not the organic blocker nifedipine. The pharmacological properties of this Ca^{2+} influx pathway virtually rule out a major contribution of voltage-gated Ca^{2+} channels or the Na^+/Ca^{2+} exchanger.

The magnitude of the Ca^{2+} elevations increases as maturation advances, suggesting a significant role of this mechanism in sperm physiology. We postulate that this novel Ca^{2+} permeation pathway regulated by intracellular pH may contribute, in combination with voltage-gated Ca^{2+} channels, to support Ca^{2+} signals required for spermatogenesis and spermiogenesis. Also, if present in mature sperm, it could be involved in the generation of Ca^{2+} signals needed to initiate important functions such as capacitation and acrosome reaction.

MATERIALS AND METHODS

Dissociation Procedure

Spermatogenic cells were obtained as in Santi et al. (1996). Briefly, decapsulated testes of adult male mice (anesthetized with ether and killed by cervical dislocation) were washed with ice-cold saline and incubated for 15 min at 28°C in Ca^{2+} -free saline containing 1 mg/ml collagenase type I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) plus 0.4 mg/ml DNase type I (Sigma Chemical Co.), pH 7.3. Washed seminiferous tubules were then incubated for 10 min in Ca^{2+} -free saline containing 0.4 mg/ml trypsin (Worthington Biochemical Corp, Freehold, NJ). Thereafter, tubules were washed twice with Ca^{2+} -free solution supplemented with 1% bovine serum albumin and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was stored at 4°C. An aliquot of this suspension was seeded into a Plexiglas recording chamber (RC-25; Warner Instruments, Hamden, CT) placed on the stage of an inverted microscope equipped with phase contrast optics (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Tokyo, Japan). The cells remained undisturbed until they attached to the bottom of the recording chamber formed by a No. 1 glass coverslip previously coated with either poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.) or Cell-Tack (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). In early experiments, the pH of the Ca^{2+} -free saline used for dissociation was adjusted to 7.3. However, we noticed that responses to internal alkalinization were more vigorous if the cells had been previously exposed to a slightly more alkaline solution. Thus, all cells used in this study were routinely dissociated and maintained at pH 7.7. Throughout the experiments, cells were superfused with saline whose pH was adjusted to 7.3. All experiments were carried out at room temperature.

Cell Identification

Cells obtained by dissociation of seminiferous tubules from adult testes belong to the most advanced stages of spermatogenesis.

Spermatocytes, spermatids, and immature sperm are easily recognized under phase contrast by their size and characteristics of nuclei and nucleolus (Bellvé et al., 1977). Pachytene spermatocytes, identified by their condensed nuclear chromatin, are the largest germ cells found in adult testes. Their small size and pale nucleus with a single central nucleolus can recognize round spermatids. Fig. 1 illustrates micrographs, viewed under phase-contrast optics, of freshly dissociated pachytene spermatocytes (A), round and condensing spermatids (B), condensing spermatid with flagellum (C), and testicular sperm (D).

Ca²⁺ and pH_i Measurements

Cells were loaded by incubation with the membrane-permeant (AM) form of the Ca²⁺ indicator dye fura-2. In other experiments, the pH-sensitive dye BCECF [(2',7')-bis(carboxymethyl)-(5,6)-carboxyfluorescein]-AM was used instead (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Incubation was initiated by adding to the recording chamber 300 μl of cell suspension and 300 μl of a solution of either 2 μM fura-2 AM or 4 μM BCECF-AM. Cells were allowed to load for 30 (fura-2) or 10 (BCECF) min at room temperature, and then rinsed continuously for another 15 min with recording medium before the beginning of the experiments. Fluorescence of both fura-2 and BCECF appeared diffusely distributed rather than punctate, suggesting that dye compartmentalization was minimal. During the experiments, cells were continuously superfused (~1 ml/min) with recording medium containing (mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES, and 5 glucose, pH 7.3.

Intracellular Ca²⁺ levels were determined as previously described (Hernández-Cruz et al., 1997). Briefly, fura-2-loaded cells were imaged with an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD), and pairs of images were digitized and recorded using alternating illumination provided by two nitrogen dye lasers tuned at 340 and 380 nm. The pulsed lasers (3-ns pulse duration) were

triggered alternately at frequencies ranging from 2 to 15 Hz under computer control. Images at 340 and 380 nm illumination were taken from an area of the coverslip free of cells and stored separately for on-line background subtraction. The key elements of the Ca²⁺ imaging system were a high numerical aperture objective (UV-F 100×, 1.3 NA; Nikon Corp.), an intensified charge coupled device camera (c2400-87; Hamamatsu, Bridgewater, NJ), and the imaging system running under the FL-2 software (Biolase Imaging System, Newton, MA). Ca²⁺ determinations in this study were obtained from individual, entire cells. In the case of sperm, fluorescence measurements were obtained from the head region. Ca²⁺ concentrations were calculated (Grynkiewicz et al., 1985) using the formula $[Ca^{2+}] = K_d (F_i/F_b) (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, where the K_d of fura-2 for Ca²⁺ is 250 nM, F_i/F_b is the ratio of fluorescence values for Ca²⁺-free/Ca²⁺-bound indicator at 380 nm excitation, R is the ratio of fluorescence at 340/380 nm for the unknown [Ca²⁺], and R_{min} and R_{max} are the ratio of fura-2 fluorescence at 340/380 nm of Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound fura-2. The values of F_i/F_b , R_{min} , and R_{max} for Ca²⁺ were determined by measuring the fluorescence of a glass capillary 100 μm in external diameter containing calibration solutions with 50 μM fura-2 (pentapotassium salt; Molecular Probes, Inc.) and known Ca²⁺ concentrations in the range 10 nM to 40 μM. Although in situ calibrations were attempted, we found it very difficult to manipulate [Ca²⁺]_i over the required range. Our Ca²⁺ measurements, based only in the in vitro calibrations, could be underestimated to some extent because of effects of viscosity and dye binding to cytoplasmic constituents (Konishi et al., 1988). By comparing fluorescence levels attained 10 min after breaking-in with patch pipettes filled with known concentrations of fura-2 pentapotassium, we estimated that fura-2 reached intracellular concentrations between 20 and 50 μM in the AM-loaded cells.

Intracellular pH measurements were conducted either by single or dual wavelength excitation. In the first case, one of the nitrogen lasers was dye-tuned at 505 nm to illuminate BCECF-

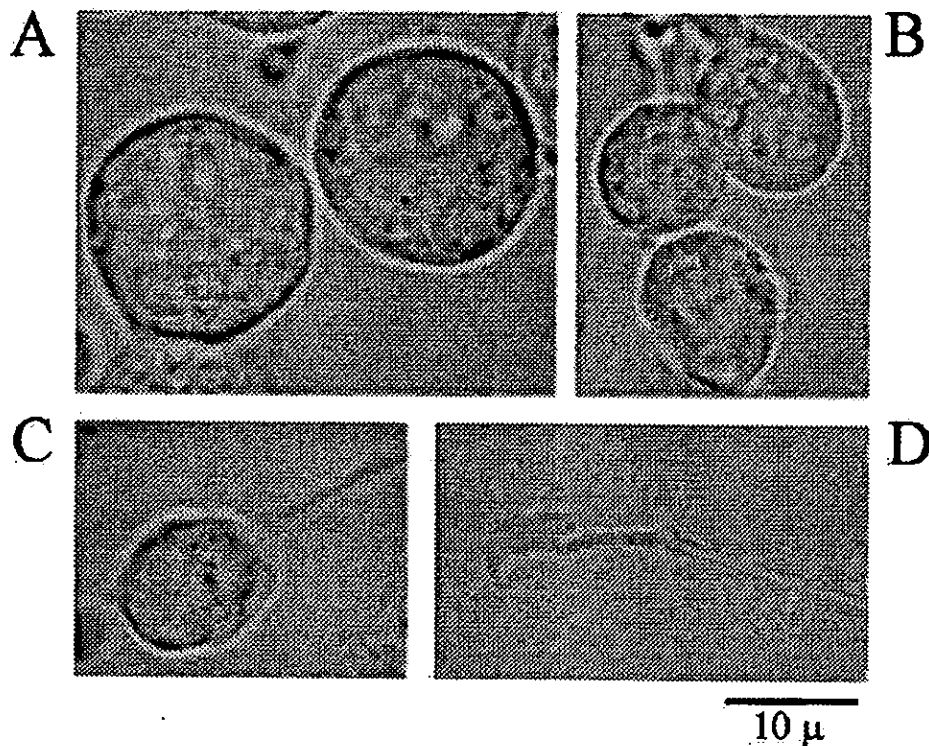


FIGURE 1. Phase contrast micrographs of acutely dissociated spermatogenic cells from adult mouse testis. (A) Pachytene spermatocytes, (B) round and condensing spermatids, (C) immature sperm with flagellum, (D) testicular sperm.

loaded spermatogenic cells. Emission light was collected at 520 nm by placing a 510-nm/520-nm dichroic/barrier cube into the microscope light pathway. In these experiments, intended for assessment of pH_i changes with high temporal resolution (<1 s), signals were plotted as differential changes in BCECF fluorescence regarding resting fluorescence ($\Delta F/F_0$). For quantitative pH_i determinations, a different fluorescence imaging system was used. Dual wavelength excitation at 440 and 500 nm was achieved by directing the output of an SLM 8000 spectrofluorometer (SLM Aminco, Rochester, NY) via a fiber optic cable into a B-2A Nikon cube (with the excitation filter removed), placed into the light pathway of an inverted microscope (emission wavelength 520 ± 10 nm). A field containing dye-loaded cells was imaged with a UV objective (UV-F 100×, 1.3 NA) and an intensified charge coupled device camera (c2400-87). Wavelength generation by the spectrofluorometer, as well as image acquisition and fluorescence determination from selected areas of interest, were controlled with the program package Image-1/FL (Universal Imaging Corp., West Chester, PA) running on a PC/AT 66 MHz computer. This system allows continuous ratio measurements of background-corrected BCECF fluorescence at 500/440-nm excitation at intervals of ~2 s. At the end of the experiment, a group of cells was imaged and their 500/440-nm fluorescence monitored during the application of 10 μM of the K⁺/H⁺ ionophore nigericin in a K⁺-rich medium (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM K-HEPES). This protocol sets pH_i equal to pH_o and was used for in situ calibration of BCECF signals. Fluorescence ratios at 500/440-nm excitation were obtained while the cells were bathed with nigericin-containing external solutions with their pH adjusted with KOH in the range 6.2–9. These ratios were then plotted and the resulting graph was fitted to the Henderson-Hasselbach equation: $\text{pH} = \text{pK}' + \log (R - R_{\text{min}}/R_{\text{max}} - R)$. The resulting values for R_{max} and R_{min} (minimum and maximum 500/400-nm ratios), and pK' were introduced in the same equation to compute pH values from the fluorescence ratios R obtained during the experiments.

Intracellular Alkalinization Procedure

The application of the weak base NH₃ was used to passively alkalinize spermatogenic cells. The solution used contained 25 mM NH₄Cl (osmolarity was maintained with appropriate changes in the amount of NaCl). The pH of the perfusate remained at 7.3. In solution, NH₃ is in chemical equilibrium with its conjugate weak acid, NH₄⁺, according to the formula: $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$. When the cells are exposed to the NH₃-NH₄⁺ solution, the NH₃ freely crosses the cell membrane and associates with a proton to form NH₄⁺. The resulting decrease in free proton concentration causes an increase in pH_i, which continues until [NH₃]_i equals [NH₃]_o. The magnitude and rate of rise of the pH_i increase with this method depends on the buffering power of the cell, its initial pH_i, [NH₃]_o in the alkalinization solution, and the membrane permeability to NH₄⁺, which tends to acidify the cell. For comparison, experiments were conducted using 25 mM of the permeable weak base trimethylamine instead of NH₄Cl. Similar results were obtained using both methods.

Both the NH₃-NH₄ solution and other test solutions were pressure-applied (10 psi) to the cells by way of puffer pipettes positioned within 100 μm with the aid of manipulators. The solenoid valves of separate Picospritzer II devices (General Valve, Fairfield, NJ) controlled solution application. Control experiments showed that with this procedure, the extracellular medium surrounding the cell was replaced within ~100 ms. Drugs used for different purposes during these experiments were 10 mM caffeine, 10 μM thapsigargin, 50 μM cyclopiazonic acid, 1 μM ionomycin, 30 μM ouabain (Sigma Chemical Co.), 5 μM ryanodine, 20 μM monensin (Calbiochem Corp., San

Diego, CA), 10 μM 2,4-dichlorobenzamil (Molecular Probes, Inc.), 5–20 μM nifedipine (Alomone, Jerusalem, Israel), 1 mM NiCl₂, 0.5 mM CdCl₂, 2 mM BaCl₂, 1 mM MnCl₂, and 2 mM SrCl₂. For experiments requiring Ca²⁺-free conditions in the external solution, CaCl₂ was omitted and the calcium chelator EGTA (0.5 mM) was added.

Electrophysiology

Whole-cell Ca²⁺ currents were recorded using the patch-clamp technique. The recording medium contained (mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 Na-HEPES, 5 glucose, 10 CaCl₂, pH 7.3. The composition of the pipette internal solution was (mM): 110 CsMe, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-BAPTA, 4 ATP-Mg, 10 mM phosphocreatine, 5 Cs-HEPES. The pH was adjusted in the range 6.5–8.1 with CsOH. The small liquid junction potential between these solutions (<5 mV; pipette potential negative against bath) was not corrected in this study. Internal Cs⁺ was sufficient to block the majority of the small outward K⁺ current expressed by these cells. Open-tip pipettes had resistances ranging between 2 and 5 Mohms when filled with pipette solution. Records were filtered (four-pole Bessel filter, bandpass 2 kHz), digitized, and stored. Pulse generation, data acquisition, and analysis were done with a PC computer governed by the pClamp program suite (Axon Instruments, Foster City, CA). Pipette capacitive currents were compensated before rupturing the patch. Once in the whole cell configuration, a holding potential of -80 mV was established, series resistance was electronically compensated, and currents elicited by brief 20-mV depolarizing pulses were averaged. These records were used to determine cell capacitance by digital integration of capacitive transients. Only cells exhibiting adequate voltage control were included in the analysis. Protocols for current-voltage (I-V) relationship and steady state inactivation were consistently used. A p/4 pulse protocol was routinely used to minimize leak and capacitive currents from the current records.

I_{Ca} activation curves were elaborated by converting peak current values from the I-V relationships to conductances using the equation $g_{\text{Ca}} = I_{\text{Ca}} / (V_m - E_{\text{Ca}})$, where I_{Ca} is the peak Ca²⁺ current, V_m the command pulse potential, and E_{Ca} the apparent reversal potential obtained by linear extrapolation of the current values in the ascending portion of the I-V curve. Conductance values were then normalized and fitted to a Boltzmann relation $g/g_{\text{max}} = \{1 + \exp[-(V - V_{0.5})/k_a]\}^{-1}$, where g is the peak conductance, g_{max} the maximal peak Ca²⁺ conductance, $V_{0.5}$ the midpoint of the activation curve, and k_a the activation steepness factor. The steady state inactivation curve was obtained by eliciting Ca²⁺ currents with a constant 24-ms test depolarization to -20 mV applied at the end of prepulses to different depolarization levels. The amplitude of these 200-ms prepulses was varied in 5-mV steps from -110 to -95 mV. Intervals of 10 s were allowed between consecutive trials to prevent accumulation of inactivation. Current to voltage curves were constructed by plotting peak currents vs. prepulse potentials, and steady state inactivation curves were obtained by normalizing the current values and fitting the data with a Boltzmann equation $I/I_{\text{max}} = \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_i]\}^{-1}$, where I is the peak current, I_{max} is the peak current when the prepulse was -110 mV, V is the prepulse potential, $V_{1/2}$ is the half-inactivation value, and k_i is the inactivation steepness parameter.

RESULTS

Controlled Rises of Intracellular pH During the Application of NH₄Cl

To test the speed of local perfusion achieved with the puffer pipette and the efficacy of NH₄Cl for inducing

internal alkalization of spermatogenic cells, single wavelength (505-nm excitation) fluorescence of BCECF-loaded cells was measured during the application of external solution containing 25 mM NH_4Cl . Fig. 2 A illustrates the effects of superfusing with NH_4Cl -containing solution a group of four BCECF-loaded spermatogenic cells. Cell alkalization is indicated by an increase in the ratio $\Delta F/F_0$. pH_i increases rapidly, reaching within 7 s a plateau that remains during the application of NH_4Cl . Upon washout of NH_4Cl , pH_i returned monotonically to baseline. The decay phases of these records could be fitted to single exponential functions, with time constants of 11.4, 11.8, 9.0, and 9.9 s.

Dual wavelength determinations of BCECF signals showed that resting pH_i in spermatogenic cells varies over the range 6.0–7.2. These values are similar to those reported from ram and pig sperm (6.3–6.7; Babcock and Pfeiffer, 1987; Tajima et al., 1987). We did not find consistent pH_i differences among cells from different stages of differentiation (pachytene spermatocytes, 6.74 ± 0.06 [mean \pm SEM], $n = 18$; round and condensed spermatids, 6.63 ± 0.04 , $n = 44$). The application of 25 mM NH_4Cl increased pH_i by 1.35 ± 0.11 pH units, $n = 13$. This pH_i rise was dependent on the concentration of NH_4Cl (e.g., 5 mM = 0.85 ± 0.04 ; 15 mM = 1.06 ± 0.06). In contrast to many somatic cells, which exhibit an acidification shift after reaching a

peak alkalization, and a rebound acidification after the removal of NH_4Cl , spermatogenic cells rarely showed any acidification with the pulse duration used in these experiments (see Fig. 2 A). This suggests that their plasma membrane lacks an appreciable permeability to NH_4^+ (Bevensee and Boron, 1995). Since the time course of intracellular alkalization by NH_4Cl can be approximated to a sustained plateau with rapid onset and offset, a correlation between changes of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i changes is possible, making unnecessary the technically more demanding simultaneous measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i (Martínez-Zaguilán et al., 1991, 1996; Wiegmann et al., 1993). Control experiments showed that the time course and amplitude of NH_4Cl -induced alkalization recorded with BCECF were not greatly affected if the cells had been previously incubated in the presence of fura-2 AM (data not shown).

Alkalinization-induced Changes of Intracellular Ca^{2+} Concentration

In contrast to resting pH_i values, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at rest varied significantly among the population of spermatogenic cells: higher resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was consistently determined in cells from more advanced stages of maturation. Thus, pachytene spermatocytes had a mean resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of 56.5 ± 7.2 nM ($n = 10$), round sperma-

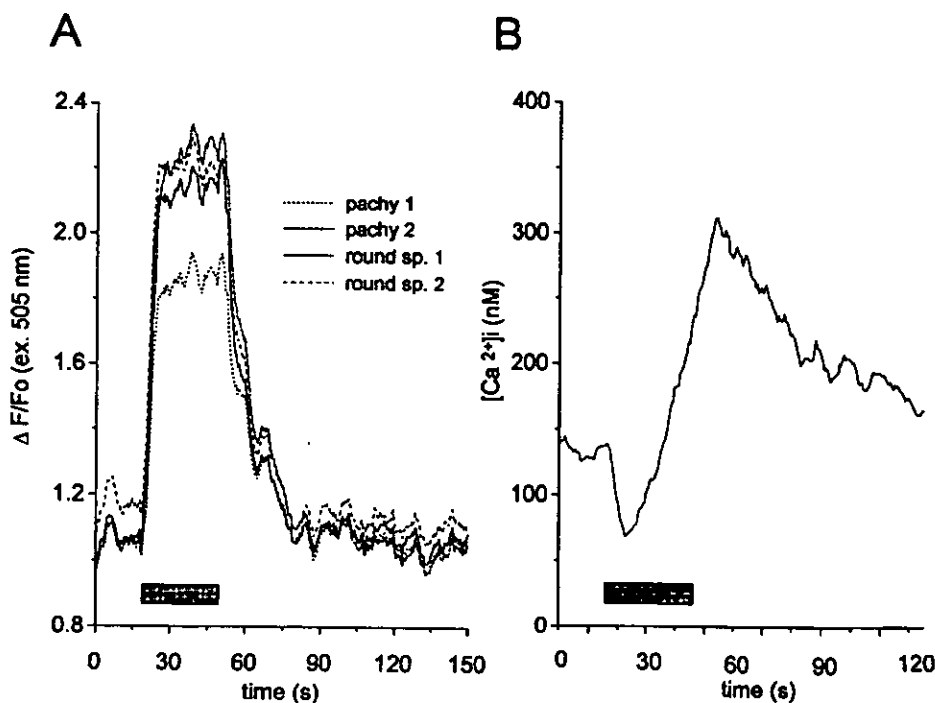


FIGURE 2. (A) Time course of intracellular alkalization induced by NH_4Cl application in two pachytene spermatocytes and two round spermatids. Cells were loaded by incubation with 10 μM BCECF-AM for 20 min. Intracellular pH was monitored as changes of BCECF fluorescence emission (see MATERIALS AND METHODS). The horizontal bar indicates the duration of NH_4Cl application. The internal pH of all cells increases rapidly upon exposure to NH_4Cl , reaching a plateau. Upon removal of the NH_4Cl , intracellular pH returns monotonically to resting levels without a rebound acidification. (B) Biphasic changes of intracellular calcium concentration induced by intracellular alkalization in a fura-2-loaded pachytene spermatocyte. A NH_4Cl -containing puffer pipette placed nearby was used for the controlled intracellular alkalization. One or more separate pipettes were used for the application of additional test solutions. The horizontal bar represents the duration of NH_4Cl application.

ids of 122.2 ± 13.8 nM ($n = 19$), and condensing spermatids of 200.2 ± 46.3 nM ($n = 5$). These differences ($P < 0.02$) are likely to be related to differentiation and maturation of male germ cells. Resting $[Ca^{2+}]_i$ remained stable over periods of observation up to 30 min, suggesting the absence of spontaneous net Ca^{2+} fluxes under our recording conditions.

Alkalinization of spermatogenic cells was generally associated with a characteristic biphasic response composed of an initial $[Ca^{2+}]_i$ drop followed by a delayed rise. An example, recorded from a pachytene spermatocyte is shown in Fig. 2 B. Similar changes in $[Ca^{2+}]_i$ were produced by application of the membrane permeant base trimethylamine (25 mM; data not shown). As illustrated in Fig. 3, the initial $[Ca^{2+}]_i$ drop is more apparent in pachytene spermatocytes (A) than in round (B) or condensing (C) spermatids. The opposite is true for the delayed $[Ca^{2+}]_i$ rise. Fig. 3 also shows the progressive increase in the magnitude of the delayed Ca^{2+}

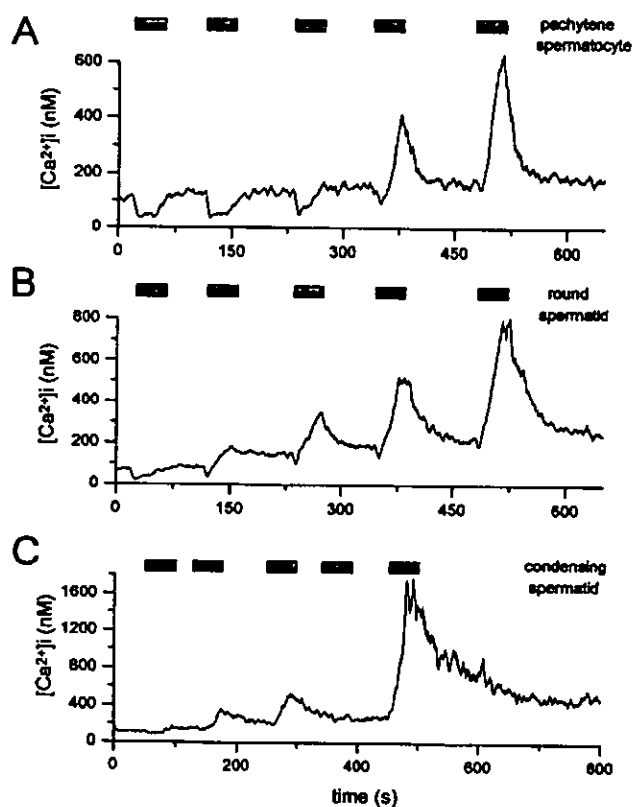


FIGURE 3. Ca^{2+} transients elicited in spermatogenic cells from different stages of maturation after successive applications of NH_4Cl (pulse duration indicated by the horizontal bars). (A) Pachytene spermatocyte, (B) round spermatid, (C) condensing spermatid. Notice that the first application induces an initial $[Ca^{2+}]_i$ drop in the pachytene spermatocyte, which is less noticeable in the round spermatid and virtually absent in the condensing spermatid. Also notice that the magnitude of the Ca^{2+} rise increases with repeated applications of NH_4Cl .

rise frequently observed in spermatogenic cells upon repeated applications of NH_4Cl (see below). Although the variability of this facilitation makes the quantitative comparison of responses to different NH_4Cl concentrations difficult, it was clear that concentrations of 10, 15, and 25 mM NH_4Cl produced progressively larger intracellular Ca^{2+} elevations, while 5 mM was ineffective (data not shown). Interestingly, alkalinization with 25 mM NH_4Cl consistently produced similar elevations of $[Ca^{2+}]_i$ in the head region of testicular sperm. An example of these recordings is illustrated in Fig. 4. Some of the testicular sperm examined were immature (they exhibited a cytoplasmic bulge in the middle piece of the flagellum and limited motility; Fig. 4, inset), but others were virtually indistinguishable from mature, epididymal sperm. Alkalinization-induced large Ca^{2+} rises appear to be specific to spermatogenic cells from adult mice since they were absent in spermatogonia obtained from testes of 1-wk-old mice (only the initial Ca^{2+} drop component of the response was observed), as well as in other cells tested under similar conditions in our laboratory; i.e., rat sympathetic neurons, rat chromaffin, and pituitary cells (data not shown).

It could be argued that $[Ca^{2+}]_i$ changes recorded with fura-2 may constitute an artifact resulting from pH_i effects on fura-2 dissociation constant for Ca^{2+}

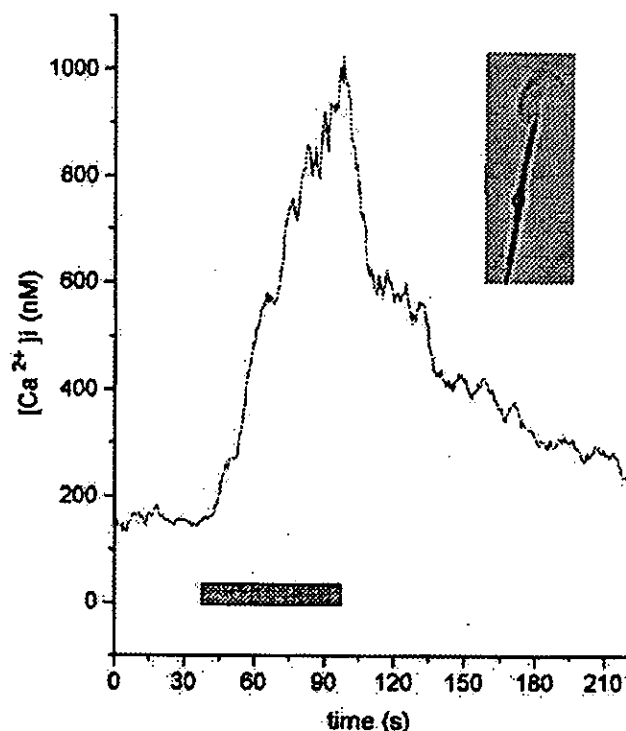


FIGURE 4. $[Ca^{2+}]_i$ transients recorded from the head region of a testicular sperm similar to the one illustrated in the inset. The horizontal bar represents the duration of NH_4Cl application. This response was obtained after the first application of NH_4Cl .

(Martínez-Zaguilán et al., 1991). However, this does not seem likely since most Ca^{2+} measurements of this study were performed at pH_i values where fura-2 properties are pH independent (Battle et al., 1993; Nitschke et al., 1996). Moreover, experimental maneuvers that modified or even abolished the pH_i -induced Ca^{2+} transients (i.e., experiments done in the absence of external Ca^{2+} ; see Fig. 8 A) rule out a significant influence of pH on the binding properties of fura-2. Additional considerations emerge from comparisons of the kinetics of the responses. The half-rise time of Ca^{2+} transients among the population of spermatogenic cells ranged from 9.9 ± 1.7 s (pachytene spermatocytes, $n = 4$) to 15.3 ± 2.9 s (condensing spermatids, $n = 4$). In contrast, half-rise times of pH_i signals were faster, ranging from 2.4 ± 0.2 s (round spermatids, $n = 5$) and 2.9 ± 0.2 s (pachytene spermatocytes, $n = 6$) to 4.5 ± 0.4 s (condensing spermatids, $n = 2$). Also, the time constant of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals in pachytene spermatocytes was 12.9 ± 2.9 s ($n = 4$), while the time constant of decay of pH_i signal was 9.9 ± 0.9 s ($n = 5$). In Fig. 5, representative traces of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i from two pachytene spermatocytes are superimposed for comparison. Since effects of internal alkalinization on fura-2 dissociation constant should be immediate, the kinetic differences between $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i responses suggest that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise constitutes a genuine physiological response.

Since alkalinization-induced Ca^{2+} rises are bigger and faster in condensing and round spermatids than in pachytene spermatocytes, we hypothesized that perhaps the rise was concealing the initial drop. Experiments shown in Figs. 3 and 6 appear to support this explanation. Fig. 6 A, obtained from a pachytene spermatocyte,

shows the increasing magnitude of alkalinization-induced Ca^{2+} rises with repeated NH_4Cl applications. The four successive responses shown in Fig. 6 A were aligned and superimposed in Fig. 6 B for comparison. As these $[\text{Ca}^{2+}]_i$ records clearly show, the use-dependent facilitation of the Ca^{2+} rise determines the gradual obliteration of the initial Ca^{2+} drop. Also, notice that the magnitude of the initial Ca^{2+} drop does not facilitate as the Ca^{2+} rise does.

Alkalinization-induced Early Ca^{2+} Drop

The initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop, which is most clearly observed in pachytene spermatocytes, (a) develops without apparent delay regarding the pH_i increase, (b) does not exhibit facilitation, and (c) lasts for as long as the NH_4Cl application is maintained when the delayed rise is absent or has been eliminated (see Figs. 3 A, 7 B, and 8 A). These characteristics suggest that the initial Ca^{2+} drop has a different mechanism than the delayed Ca^{2+} rise. Several hypotheses can be offered to explain the initial Ca^{2+} drop. We favor the most parsimonious one; that is, upon entering the cell, NH_3 displaces H^+ from Ca^{2+} binding sites on proteins, increasing the buffering power of the cell and hence diminishing resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Further experiments are being planned to determine the precise nature of the initial Ca^{2+} drop. The remainder of this paper will focus on the nature of the delayed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise.

Use-dependent Facilitation of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Rise

In early experiments, we noticed that preincubation of the cells in a slightly more alkaline medium promoted the appearance of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises. Thus, cells incubated at external pH 7.7 had a $\text{pH}_i = 6.6 \pm 0.03$ ($n = 62$) and

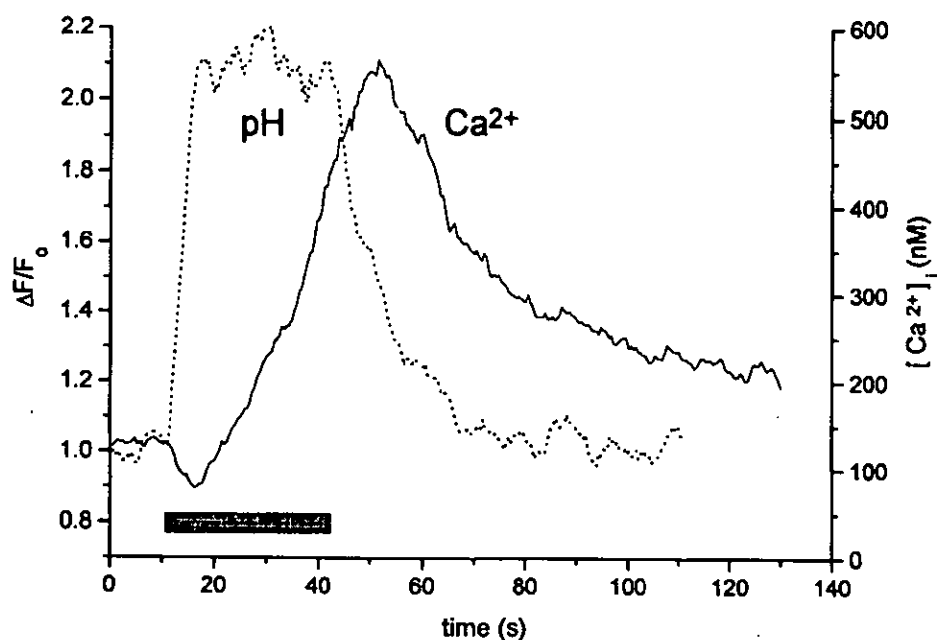


FIGURE 5. Representative recordings of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i obtained from two different pachytene spermatocytes loaded with BCECF and fura-2, respectively. Traces were superimposed for comparison. Notice that the initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop occurs almost simultaneously with the pH_i rise elicited by NH_4Cl application (horizontal bar), while the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation appears with a significant delay.

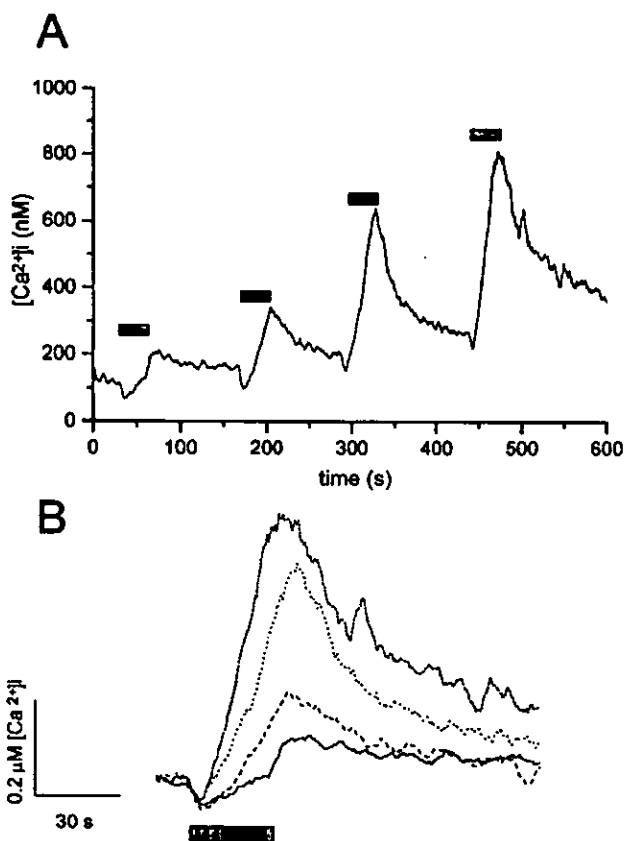


FIGURE 6. Facilitation of $[Ca^{2+}]_i$ transients. (A) $[Ca^{2+}]_i$ rises recorded from a pachytene spermatocyte show use-dependent facilitation upon repeated application of NH_4Cl (horizontal bars). Notice that both the magnitude and the rate of rise of $[Ca^{2+}]_i$ transients became larger. Conversely, $[Ca^{2+}]_i$ transients decay more slowly after repeated intracellular alkalinizations. (B) Superimposed responses to the NH_4Cl applications shown in A. Traces were aligned both vertically and horizontally for clarity. Notice that the magnitude of the initial $[Ca^{2+}]_i$ drop remains invariant, becoming progressively obliterated by the delayed $[Ca^{2+}]_i$ rise.

quite often responded with $[Ca^{2+}]_i$ rises to the application of 25 mM NH_4Cl , while cells kept at pH 7.3 were significantly more acidic (6.4 ± 0.03 , $n = 100$, $P = 2.1 \times 10^{-8}$) and responded less frequently with increases in $[Ca^{2+}]_i$ (only the initial Ca^{2+} drop was observed). Therefore, we speculated that the appearance of alkalinization-induced $[Ca^{2+}]_i$ rises could be more likely to occur when pH_i reaches a critical value. Support for this "pH_i threshold hypothesis" comes from experiments such as the one illustrated in Fig. 7, A and B. Here, two initially unresponsive cells (notice the lack of $[Ca^{2+}]_i$ rises upon repeated pulsing with NH_4Cl), were incubated for 2 min in the presence of 20 μM monensin, a Na^+ ionophore that exchanges external Na^+ for internal H^+ , thus alkalinizing the cytoplasm. Shortly after incubation in the presence of monensin, the cells began to respond with small Ca^{2+} rises to the application of NH_4Cl . Moreover, after

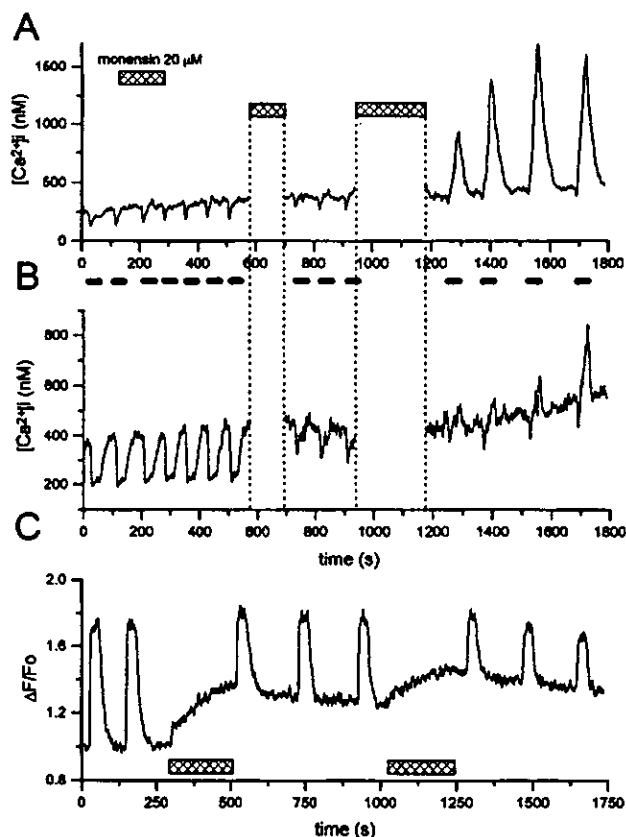


FIGURE 7. Development of $[Ca^{2+}]_i$ responses after incubation with monensin. (A and B) Recordings obtained from two fura-2-loaded spermatogenic cells that initially failed to show a $[Ca^{2+}]_i$ rise component upon stimulation with NH_4Cl (pulses indicated with the filled horizontal bars). After 2-min incubation with 20 μM monensin, cells began to respond with small Ca^{2+} rises. These responses increased after a second monensin incubation for 4 min. Monensin-treated cells showed both Ca^{2+} rises and use-dependent facilitation of the responses. (C) Recording of fluorescence changes in a BCECF-loaded spermatogenic cell. The experiment was designed to determine if use-dependent facilitation results from a progressive increase in resting pH_i . The first part of the record shows that pH_i returns completely to resting levels between successive NH_4Cl applications. The second part of the record shows that after monensin application, basal pH_i rises without increasing the magnitude of the pH_i rise elicited by NH_4Cl application. Also notice that responses to NH_4Cl after monensin incubation decay completely to prestimulation levels.

a second monensin application for 4 min, cells showed both Ca^{2+} rise and use-dependent facilitation of the responses. In separate experiments, we noticed that the pH_i of BCECF-loaded cells climbed from 6.57 ± 0.17 to 6.89 ± 0.20 ($n = 3$) after 4 min of monensin application. These data suggest that cells begin to show $[Ca^{2+}]_i$ rises in response to alkalinization when resting pH_i exceeds ~ 6.7 . As explained later, this finding may be relevant for the sperm capacitation process.

As previously shown, spermatogenic cells display facilitation of the Ca^{2+} rise upon repeated applications of

NH₄Cl. Sometimes this phenomenon is accompanied by a sustained increase in resting [Ca²⁺]_i, but not necessarily. In fact, normal facilitation is observed in cells that had been pulsed with NH₄Cl in Ca²⁺-free medium, thus preventing Ca²⁺ influx (data not shown). The question that immediately rises is, does use-dependent facilitation also result from a progressive, sustained increase in resting pH_i? The experiment shown in Fig. 7 C was designed to test this hypothesis. As shown in the first part of the record (initial two responses), the pH_i returns completely to resting levels between successive NH₄Cl pulses. Control experiments showed that both the sizes of pH_i deflections and the resting pH_i remained unchanged during repetitive NH₄Cl applications (data not shown). The second part illustrates the effects of monensin application. Clearly, monensin raises basal pH_i without increasing the magnitude of the pH_i change resulting from each NH₄Cl application. Also, the response to NH₄Cl in the presence of monensin decays completely to prestimulation levels. Similar results were obtained in five additional cells. These findings rule out an incremental rise of resting pH_i as an explanation to the use-dependent facilitation phenomenon. More likely, a pH-dependent regulatory mechanism capable of inducing long term modifications of the permeation pathway either directly or by way of second messengers (e.g., cyclic AMP; Trimmer and Vacquier, 1986; Gabers, 1989; Beltrán et al., 1996; Arnoult et al., 1997) underlies the use-dependent facilitation of the Ca²⁺ rise. These and other possible explanations to the facilitation phenomenon are yet to be explored.

Source of Ca²⁺ Underlying the [Ca²⁺]_i Rise

The [Ca²⁺]_i elevation secondary to internal alkalization could result from plasmalemmal Ca²⁺ influx, intracellular Ca²⁺ release, or both. Experiments such as those exemplified in Fig. 8 explored the possible contribution of external Ca²⁺. Here, two puffer pipettes were positioned near the cell and the recording chamber was continuously bathed with Ca²⁺-free external solution when indicated. Both pipettes contained NH₄Cl, but only one of them contained 2 mM CaCl₂. As shown in Fig. 8 A, the application of NH₄Cl in the complete absence of external Ca²⁺ resulted only in the appearance of the [Ca²⁺]_i drop. When the pulse of NH₄Cl was delivered through the pipette containing 2 mM Ca²⁺, the [Ca²⁺]_i rise reappeared, masking the initial drop. In this case, as in most spermatocytes examined, Ca²⁺ influx is clearly required for the alkalization-induced [Ca²⁺]_i rise. This result may have two possible explanations: either Ca²⁺ influx is the sole source of the Ca²⁺ transient or a combination of influx and release (that is, through the process termed Ca²⁺-induced Ca²⁺ release) is involved. Fig. 8 B illustrates the result of a similar experiment in a condensing spermatid. The main dif-

ference here is that in spite of the absence of external Ca²⁺, alkalization can still produce a small [Ca²⁺]_i rise. The source of this [Ca²⁺]_i rise remains to be identified, although an intracellular Ca²⁺ source is the most likely explanation. It should be pointed out that responses such as those illustrated in Fig. 8 B were observed in the minority (~10%) of all spermatids examined.

To directly assess the availability of releasable Ca²⁺ from intracellular stores, we tested the effects of caffeine and ryanodine (10 mM and 5 μM, respectively). These plant alkaloids are agonist and antagonist, respectively, of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels. As shown in Fig. 9, A and B, neither caffeine nor ryanodine per se induced a significant Ca²⁺ rise in spermatogenic cells. We also tested the effects of thapsigargin and cyclopiizonic acid, specific inhibitors of the Ca²⁺-ATPase of the

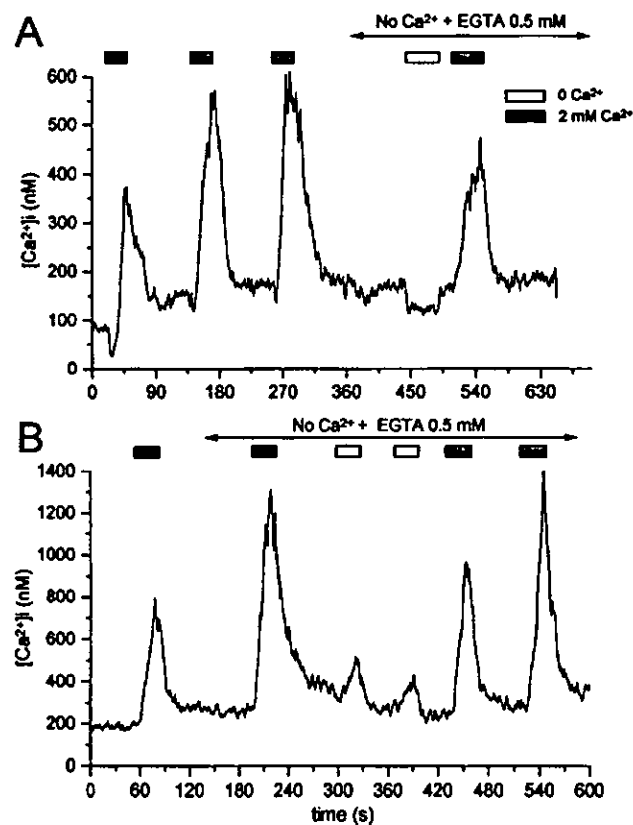


FIGURE 8. Contribution of external Ca²⁺ to the alkalization-induced [Ca²⁺]_i transients in spermatogenic cells. Ca²⁺ rises were recorded first in normal recording solution, and then in a solution containing no added Ca²⁺ and 0.5 mM EGTA. Along with the standard puffer pipette, a second pipette containing NH₄Cl and no Ca²⁺ was used to induce intracellular alkalization while keeping Ca²⁺-free conditions. Responses were obtained from a pachytene spermatocyte (A) and a condensing spermatid (B). Notice that when NH₄Cl is applied in the complete absence of external Ca²⁺, the delayed Ca²⁺ rise is either suppressed (A) or greatly reduced (B). Also, notice in A that the initial Ca²⁺ drop is obliterated by the delayed Ca²⁺ rise becomes discernible upon removal of extracellular Ca²⁺.

endoplasmic reticulum (10 and 50 μM , respectively). As shown in Fig. 9, C and D, when these drugs were applied, they produced either no effect or a modest Ca^{2+} release. Interestingly, these inhibitors only elicited noticeable Ca^{2+} rises in cells from less advanced stages of differentiation (e.g., pachytene spermatocytes). When internal alkalization was induced after the application of these drugs (the effects of some of which are considered irreversible), Ca^{2+} signals of normal appearance were elicited (see Fig. 9, A–C). As shown in Fig. 9 E, even the application of 1 μM ionomycin (a di-

valent cation ionophore used to increase the permeability of biological membranes to Ca^{2+} , which also depletes a variety of intracellular Ca^{2+} stores), without external Ca^{2+} , produced small Ca^{2+} rises in spermatogenic cells. To test the efficacy of ionomycin, the same cells were exposed to the ionophore while bathed in Ca^{2+} -free medium, and then perfused with a solution containing no ionomycin and 2 mM Ca^{2+} . This was rapidly followed by a large Ca^{2+} rise (Fig. 9 E, middle). This rise may result from Ca^{2+} influx through ionomycin remaining in the plasma membrane, store-operated

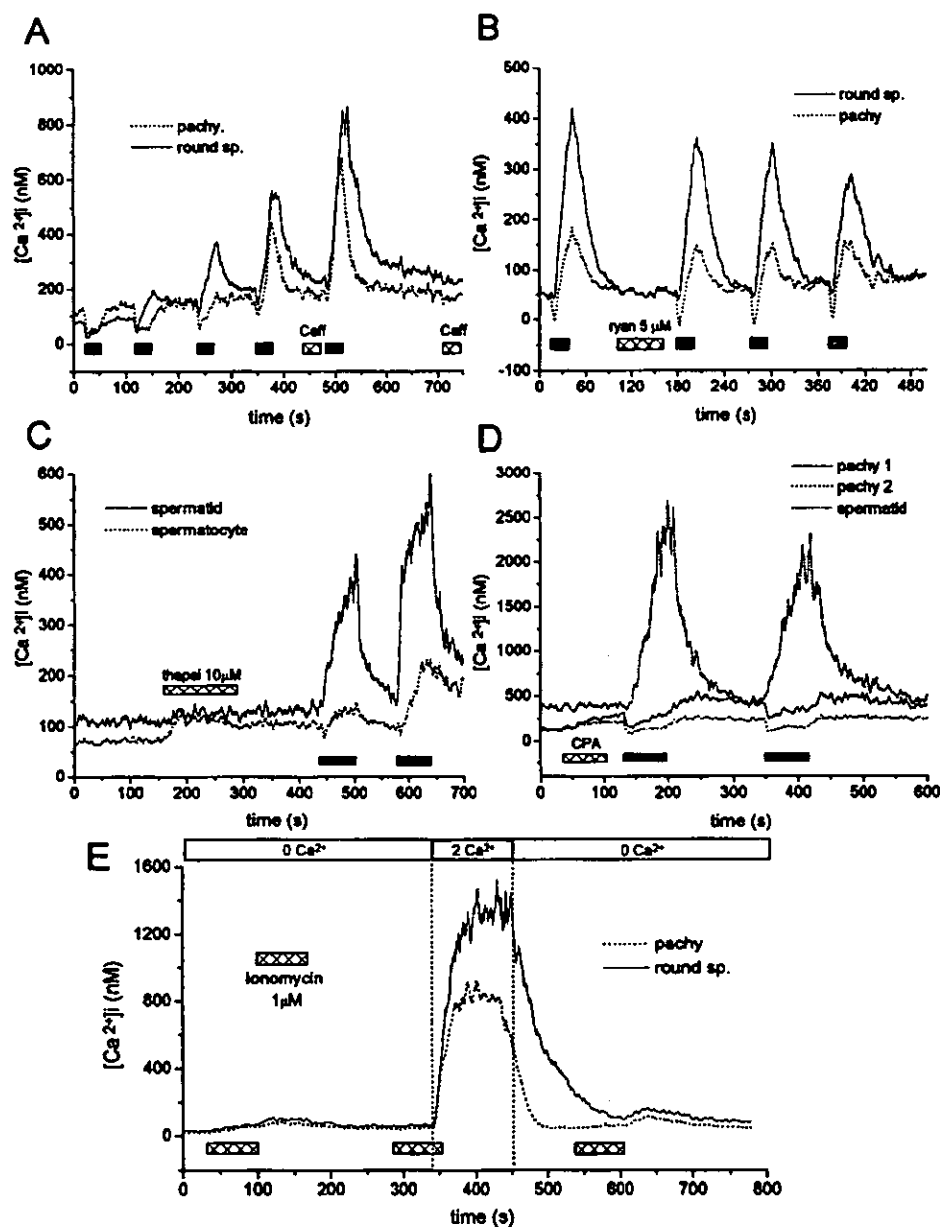


FIGURE 9. Effects of agents affecting Ca^{2+} mobilization from intracellular stores. (A) Ca^{2+} recordings obtained from a pachytene spermatocyte and a round spermatid upon repeated applications of NH_4Cl . When indicated, caffeine (10 mM) was applied from a second puffer pipette. Caffeine neither induced Ca^{2+} rises in spermatogenic cells nor affected their responses to subsequent NH_4Cl applications. (B) In another cell pair, 5 μM ryanodine was also ineffective as a Ca^{2+} release agent. Although the responses to NH_4Cl diminished slightly after ryanodine exposure, this result was not observed in other cells tested. (C) The effects of 10 μM thapsigargin were tested in a round spermatid and a pachytene spermatocyte. The figure is representative of more than 12 cells similarly examined. Notice that only the relatively less differentiated spermatocyte showed a modest Ca^{2+} rise. (D) Effects of cyclopiazonic acid (CPA) on resting Ca^{2+} levels and responses to alkalization in three spermatogenic cells. CPA induced small Ca^{2+} rises in both pachytene spermatocytes, but not in the round spermatid. Responses to NH_4Cl after incubation with thapsigargin or CPA appear similar to those of untreated cells. (E) Effects of ionomycin. When two spermatogenic cells were exposed to 1 μM ionomycin without external Ca^{2+} , they exhibit small Ca^{2+} rises, suggesting that the Ca^{2+} content of the intracellular reservoirs is low. In contrast, the same stimulus induced a large increase of intracellular Ca^{2+} when external medium was switched to one containing normal

external $[\text{Ca}^{2+}]$. This elevation is likely due to plasmalemmal Ca^{2+} influx through ionomycin pores. Reapplication of ionomycin without external Ca^{2+} after such a large Ca^{2+} load is still unable to release a substantial amount of Ca^{2+} .

channels activated by depletion during the initial ionomycin application, or both (see below). When ionomycin was applied shortly after this substantial Ca^{2+} load, it was still ineffective to produce a large Ca^{2+} release, suggesting that Ca^{2+} uptake into intracellular stores is negligible within the time scale of this experiment. Taken together, these data suggest that the amount of Ca^{2+} available for release from rapidly exchanging intracellular reservoirs is too small to directly contribute to the Ca^{2+} transient induced by cytosolic alkalinization. Nonetheless, intracellular Ca^{2+} release could contribute indirectly, by activating store-operated channels (SOCs) whose presence has not been examined in spermatogenic cells. An alternative interpretation of the experiment shown in Fig. 9 E could be that, after the initial treatment with ionomycin, the stores become depleted, leading to the opening of SOCs. Subsequent addition of external Ca^{2+} would then result in a large Ca^{2+} influx mediated by SOCs rather than by ionomycin remaining in the plasmalemma. In fact, such a protocol (depletion of stores in Ca^{2+} -free medium followed by readmission of external Ca^{2+}) is often used to reveal SOCs (Parekh and Penner, 1997). To explore this possibility, we performed the classical protocol, but using thapsigargin instead of ionomycin. Thapsigargin was chosen because it specifically inhibits intracellular pumps and lacks ionophoric or detergent activity. The result of such an experiment is shown in Fig. 10. Here, a group of eight spermatogenic cells was exposed to thapsigargin ($10 \mu\text{M}$) for 3 min with the aid of a puffer pipette (Ca^{2+} -free conditions effective for the whole time). A few minutes later, a medium containing 2 mM Ca^{2+} was applied to the cells with a second puffer pipette. This was followed by a slow and sustained Ca^{2+} influx that ceased upon removal of external Ca^{2+} . These results suggested that (a) thapsigargin depleted the stores, albeit without an apparent Ca^{2+} rise, and (b) spermatogenic cells appear to express SOCs. It remains to be explored whether a pH-induced depletion of Ca^{2+} stores may lead to opening of SOCs and if this permeation pathway can account for the alkalinization-induced Ca^{2+} transient (see DISCUSSION).

Permeation Properties of the pH-sensitive Ca^{2+} Influx Pathway in Spermatogenic Cells

To examine the selectivity of the Ca^{2+} permeation pathway, the recording chamber was continuously perfused with Ca^{2+} -free external solution, and either Sr^{2+} or Ba^{2+} substituted Ca^{2+} in the NH_4Cl -containing puffer pipette. This protocol was used to warrant that the cells were only exposed to the test divalent cation during the episode of intracellular alkalinization. Fig. 11, A and B, shows results obtained from two round spermatids. Here, fluorescence ratios of 340/380 nm were plotted rather than intracellular concentrations of divalent cations be-

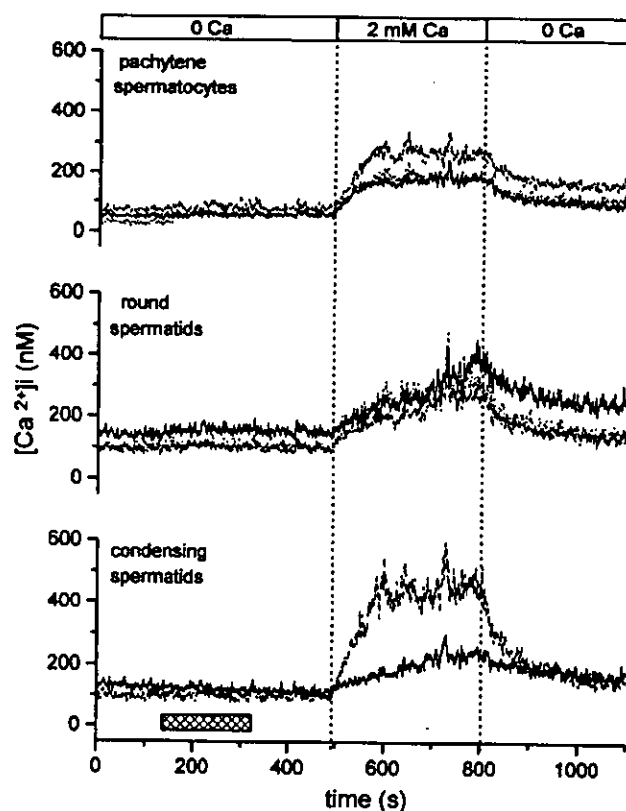


FIGURE 10. Evidence for the presence of store-operated channels in spermatogenic cells. A group of eight spermatogenic cells, continuously bathed in Ca^{2+} -free medium, were transiently exposed to Ca^{2+} -free medium containing $10 \mu\text{M}$ thapsigargin when indicated (horizontal bar). Thapsigargin induced either no response or only a small Ca^{2+} rise, suggesting either that the Ca^{2+} content of the intracellular reservoirs is low or that Ca^{2+} is extruded from the cell as fast as it is released. When the cells were perfused with a puffer pipette filled with medium containing 2 mM Ca^{2+} , an increase of intracellular Ca^{2+} was observed. The same maneuver had no effects on Ca^{2+} levels before the application of thapsigargin (not shown). Ca^{2+} elevation upon exposure to external Ca^{2+} is likely due to plasmalemmal Ca^{2+} influx mediated by store operated channels.

cause fura-2 dissociation constants for Sr^{2+} and Ba^{2+} differ considerably from that of Ca^{2+} . Although these experiments only provide semi-quantitative information of divalent plasmalemmal fluxes, they clearly demonstrate that Ca^{2+} , and to a large extent Sr^{2+} and Ba^{2+} , can permeate through the influx pathway made available by intracellular alkalinization.

To further examine the permeation characteristics of the Ca^{2+} influx pathway, cells were bathed with Ca^{2+} -free saline, and then exposed to the NH_4Cl -containing solution, first in the absence, and then in the presence of 1 mM Mn^{2+} . Here, fura-2 fluorescence was monitored at 340-nm excitation. At this excitation wavelength, Ca^{2+} or Mn^{2+} influx should lead to opposite signals: Ca^{2+} influx producing a fluorescence increase, and Mn^{2+} entry producing a decrease because of

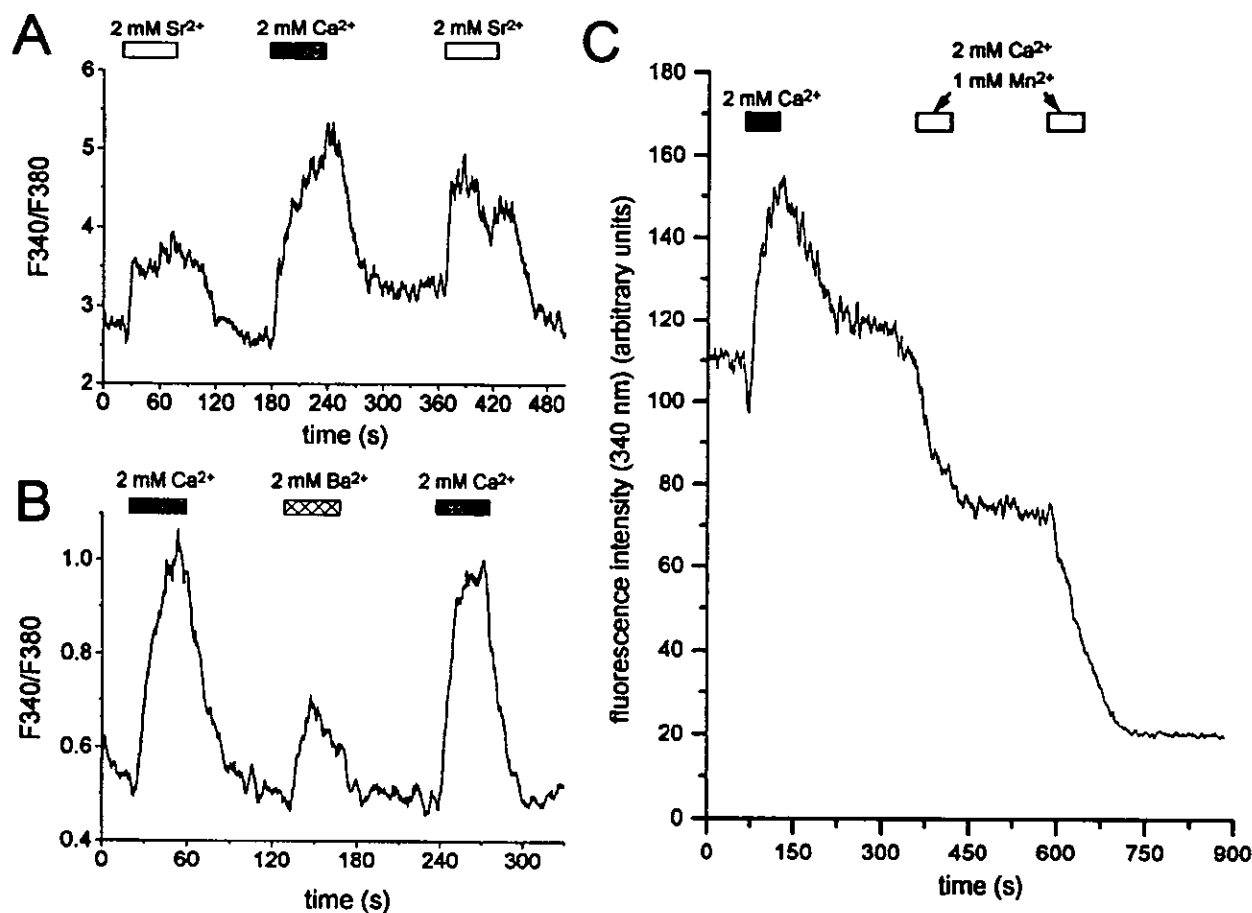


FIGURE 11. Selectivity of the permeation pathway induced by intracellular alkalinization. (A and B) Experiments were conducted in round spermatids to explore the effects of substituting Sr^{2+} or Ba^{2+} for Ca^{2+} in the NH_4Cl -containing solution. Ca^{2+} -free solution supplemented with 0.5 mM EGTA was continuously superfused to ensure that the cell was exposed only to the test divalent cation during intracellular alkalinization. Only fluorescence ratios 340/380 nm are shown since dissociation constants of fura-2 for Sr^{2+} and Ba^{2+} differ considerably from that of Ca^{2+} . Both Sr^{2+} (A) and Ba^{2+} (B) can permeate through the Ca^{2+} influx pathway made available by intracellular alkalinization. (C) Mn^{2+} permeates the alkalinization-induced Ca^{2+} influx pathway. In this experiment, fluorescence of fura-2 at 340 nm was monitored. At this wavelength Ca^{2+} influx appears as a fluorescence increase, while Mn^{2+} entry appears as a decrease in fluorescence. Application of NH_4Cl in the absence of Mn^{2+} (filled bar) induces the characteristic initial drop followed by delayed Ca^{2+} rise. In contrast, a fluorescence decrease is observed when alkalinization is produced with a puffer pipette also containing 1 mM Mn^{2+} (open bars). Notice that each application of NH_4Cl in the presence of Mn^{2+} produces a step-like irreversible fluorescence loss, consistent with Mn^{2+} entering the cell and quenching a fraction of fura-2 fluorescence.

quenching of fura-2 emission. As shown in Fig. 11 C, the application of NH_4Cl without Mn^{2+} (filled bar) induces the characteristic initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop followed by a delayed increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In contrast, in the presence of 1 mM Mn^{2+} (open bars), alkalinization only produces a decrease in fluorescence. Moreover, a drop in fluorescence emission follows each application of NH_4Cl . This is consistent with Mn^{2+} entering the cell through the permeation pathway regulated by intracellular alkalinization, followed by the irreversible quenching of a fraction of fura-2 by Mn^{2+} . It is noteworthy that fluorescence increases due to Ca^{2+} influx were not observed during internal alkalinization in the presence of Mn^{2+} . One interpretation is that the pH-regulated perme-

ation pathway is exceedingly more permeable to Mn^{2+} than to Ca^{2+} . However, a comparison based on fluorescence changes is inappropriate because fura-2 has a 40-fold higher affinity for Mn^{2+} than for Ca^{2+} (Grynkiewicz et al., 1985), and a small Ca^{2+} influx could be vastly underestimated. Clearly, membrane current measurements would be the correct approach to decide this matter.

Role of Voltage-gated Ca^{2+} Channels in the Alkalinization-induced Ca^{2+} Influx (Effects of Inorganic and Organic Ca^{2+} Channel Blockers)

Recent reports have suggested that T-type Ca^{2+} channels expressed in late spermatogenic cells may contrib-

ute to the Ca^{2+} influx necessary to initiate the sperm acrosome reaction (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996). This notion is supported by earlier observations that Ni^{2+} , dihydropyridines such as PN200-110, and nifedipine (Florman et al., 1992), as well as amiloride and pimozone, which inhibit the acrosome reaction, also block spermatogenic cell Ca^{2+} currents (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996).

To explore whether voltage-gated Ca^{2+} channels contribute to the Ca^{2+} permeation pathway induced by internal alkalization, we tested the effect of inorganic divalent Ca^{2+} channel blockers Cd^{2+} and Ni^{2+} . Cd^{2+} (0.5 mM) and Ni^{2+} (0.2 and 1 mM) invariably inhibited the delayed Ca^{2+} transient. Ni^{2+} was able to completely block Ca^{2+} rises when they were small, but when the responses became facilitated after repeated NH_4Cl applications, a progressively larger fraction of the Ca^{2+} rise remained unblocked (data not shown). Fig. 12 A shows the effects of pulsing with NH_4Cl , a pachytene spermatocyte, both with and without 1 mM Ni^{2+} . This protocol was designed to take into account the facilitatory effect resulting from repeated alkalization on the magnitude of the Ca^{2+} transients. Alkalization-induced responses were smaller and rose more slowly in the presence of Ni^{2+} . The effect of Ni^{2+} on the kinetics of Ca^{2+} transients in another pachytene spermatocyte is shown in Fig. 12 B. Here, responses to alternate appli-

cations of NH_4Cl with and without Ni^{2+} are superimposed for comparison. Upon the application of NH_4Cl plus Ni^{2+} , the delayed Ca^{2+} rise was drastically inhibited, without affecting the kinetics or magnitude of the initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drop. Ni^{2+} inhibited alkalization-induced Ca^{2+} transients at concentrations as low as 200 μM .

In separate experiments, we tested the effects of nifedipine (an organic blocker effective on the Ca^{2+} channels present in spermatogenic cells; Santi et al., 1996) on the Ca^{2+} transients elicited by internal alkalization. Fig. 12 C illustrates responses of a pachytene spermatocyte to the repeated application of NH_4Cl , first in the absence, and then in the presence of 20 μM nifedipine. Nifedipine did not affect the magnitude of the Ca^{2+} transients or their use-dependent facilitation. Since dihydropyridines are very photolabile, the lack of effect on the alkalization-induced Ca^{2+} permeation pathway could be due to its destruction by the laser illumination. To rule out this possibility, the last puffer application of NH_4Cl and nifedipine in Fig. 12 C was given with the laser illumination omitted. At the end of the NH_4Cl application, the laser illumination was turned on again. It is obvious from this recording that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ had risen to an even higher level than in the previous NH_4Cl application, suggesting that photolysis of nifedipine is not responsible for the drug's lack of effect. Additional experiments, carried out with 20 μM nifedipine bathing the recording chamber for >10 min be-

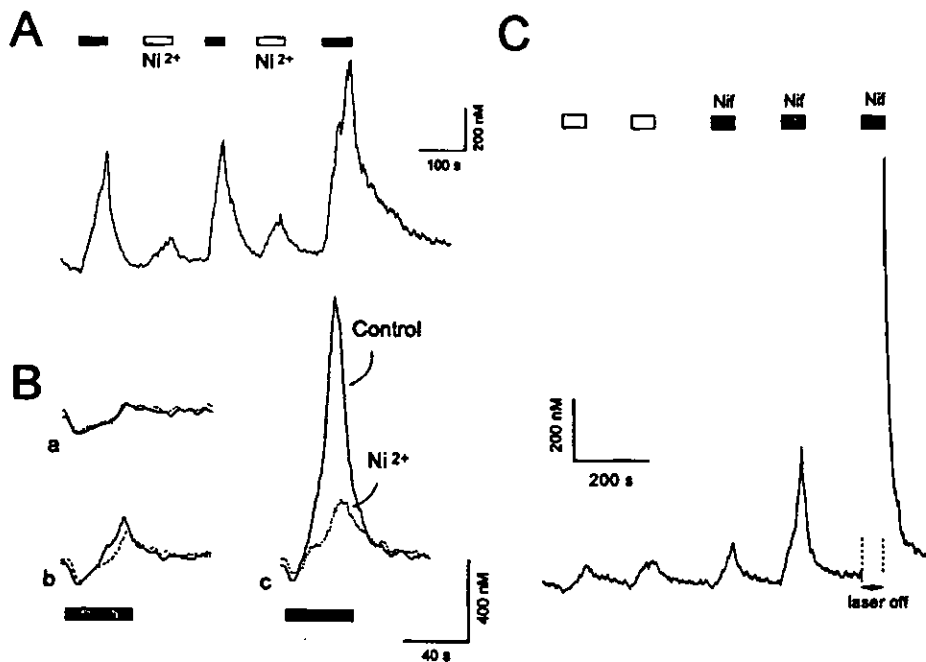


FIGURE 12. Effects of Ni^{2+} and nifedipine on the alkalization-induced Ca^{2+} entry pathway. (A) Ca^{2+} transients recorded from a pachytene spermatocyte upon alternate puffer applications of NH_4Cl both in the absence (filled bars) and presence (open bars) of 1 mM NiCl_2 . The bathing external solution contained no Ca^{2+} , while the solution in both pipettes contained 2 mM Ca^{2+} . Alkalization-induced Ca^{2+} transients were consistently smaller and had a slower rate of rise in the presence of Ni^{2+} . (B) Comparison of responses obtained from a different spermatocyte upon alternate intracellular alkalizations by NH_4Cl applications, both in the absence (continuous line) and presence (dashed line) of 1 mM Ni^{2+} . a-c are consecutive alternate responses. Notice that Ni^{2+} inhibits the delayed Ca^{2+} rise without affecting the initial Ca^{2+} drop. (C) Responses obtained from a pachytene spermatocyte to the repeated application of NH_4Cl , first in the absence (open bars) and then presence (filled bars) of 20 μM nifedipine in the pipette solution. The last puffer application of NH_4Cl and nifedipine was given with the laser illumination turned off to prevent the possible photolysis of the drug.

Responses obtained from a pachytene spermatocyte to the repeated application of NH_4Cl , first in the absence (open bars) and then presence (filled bars) of 20 μM nifedipine in the pipette solution. The last puffer application of NH_4Cl and nifedipine was given with the laser illumination turned off to prevent the possible photolysis of the drug.

fore the beginning of the recording, confirmed that nifedipine does not inhibit the Ca^{2+} permeation pathway. These pharmacological results were inconclusive as far as the role of T-type Ca^{2+} channels was concerned, since an effective blocker (Ni^{2+}) inhibited the response to alkalinization, while the other (nifedipine) did not.

Effects of Intracellular Alkalinization on the Properties of T-type Ca^{2+} Currents

It has been pointed out that the fast inactivation of T-type Ca^{2+} channels upon membrane depolarization would prevent them from significantly contributing to the sustained elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ required for the acrosome reaction (Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996a, 1996b). Nevertheless, different mechanisms can be postulated by which the activity of T-type Ca^{2+} channels could allow more prolonged Ca^{2+} rises. T-type Ca^{2+} channels could contribute to a sustained Ca^{2+} rise if ZP3-induced intracellular signals, such as the elevation of pH_i (Florman et al., 1989; Florman, 1994) or a change in the phosphorylation state of the channels (Liévano et al., 1996; Arnoult et al., 1997), drastically affect one or more of their biophysical properties (e.g., activation threshold, rate of inactivation, "window current," number of active channels). For instance, a sustained Ca^{2+} influx carried by T-type Ca^{2+} channels could be expected if they become substantially less rapidly inactivating or if the window current (the area under the point of crossing of activation and steady state inactivation curves) increases.

To test directly the possibility that alkalinization affects Ca^{2+} currents, the currents were recorded using pipette internal solutions tailored at two different pH_i values (7.4 and 8.1), as well as external solution at pH 8.1. The results are summarized in Fig. 13 A, which illustrates peak Ca^{2+} current densities obtained for these experimental conditions (see Santi et al., 1996). When the intracellular pH was raised from 7.4 to 8.1 (keeping external pH constant), peak Ca^{2+} current density increased significantly (from 7.52 ± 0.41 to $9.06 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). A larger increase (to $9.52 \pm 0.41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) was observed when external pH increased from 7.3 to 8.1 (keeping pH_i constant). Current density measured in cells recorded with an internal solution made to pH 6.5 (close to the cell's measured resting pH_i) was $7.45 \pm 0.22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 3$. This value is not different from that obtained at pH_i 7.4. Representative families of Ca^{2+} currents obtained at pH_i 7.4 and 8.1 and pH_o 8.1 are shown in Fig. 13 B. Mean I-V relationships obtained from the three experimental groups are shown in Fig. 14 A. Rising intracellular pH from 7.4 to 8.1 significantly increased peak Ca^{2+} current density (from 6.31 ± 0.83 to $8.49 \pm 0.25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). A larger increase (to $9.62 \pm 0.61 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) was observed when external pH increased from 7.3 to 8.1. Besides the increase in peak current density, the peak of the I-V curve shifted ~ 5 mV in the hyperpolarizing direction when the external pH changed from 7.3 to 8.1 (see Fig. 14 A). No such shift was observed when internal pH changed from 7.4 to 8.1. The voltage dependence of steady state activation and inactivation of Ca^{2+} currents was determined

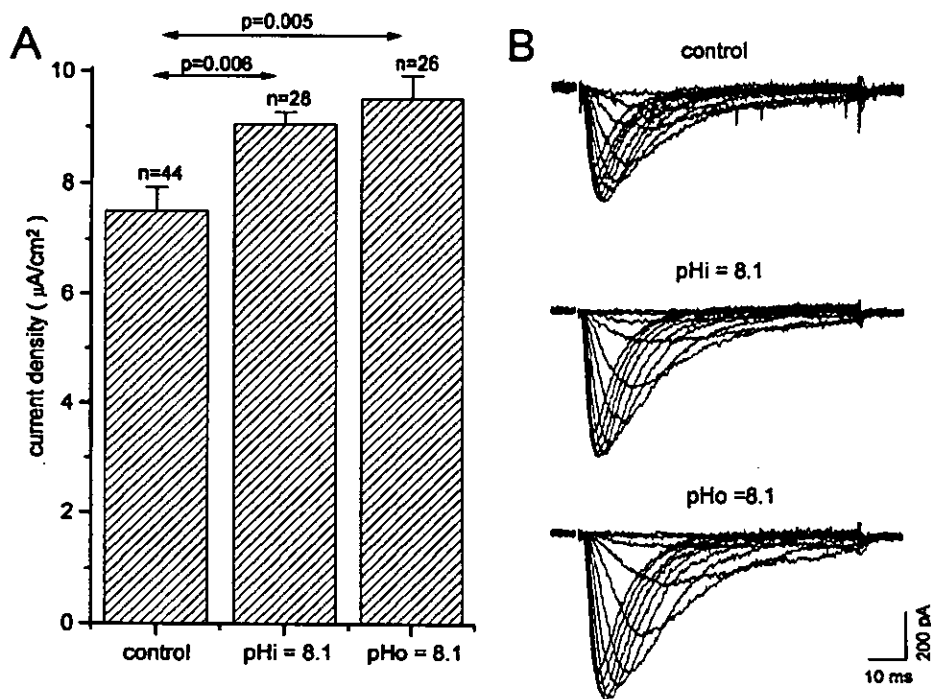


FIGURE 13. (A) Peak Ca^{2+} current densities obtained at two different pH_i (7.4 and 8.1), as well as at pH_o 8.1. The current density increased from 7.52 ± 0.41 to $9.06 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ when the intracellular pH was raised from 7.4 to 8.1, and to $9.52 \pm 0.41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ when external pH increased from 7.3 to 8.1. The level of significance of differences between groups is indicated. (B) Representative Ca^{2+} current families obtained at pH_i 7.4 and 8.1 as well as at pH_o 8.1. The membrane potential was stepped (100 ms) from -70 to -15 mV in 5-mV increments. The membrane potential was held at -80 mV.

for the three experimental groups as explained in MATERIALS AND METHODS (see also Santi et al., 1996). These results are summarized in Table I. Extracellular alkalization from pH 7.3 to 8.1 produced a 5-mV negative shift in $V_{a1/2}$ (potential of half-maximal activation). Conversely, intracellular alkalization in the same range did not affect voltage dependence of activation or inactivation. The corresponding steepness pa-

rameters k_s and k_i remained unaffected by either external or internal alkalization.

T-type Ca^{2+} currents present in spermatogenic cells peak after a few milliseconds and decay rapidly with time courses well fitted by single exponential functions. The activation and inactivation kinetics of these currents are voltage dependent (Santi et al., 1996). To assess for possible internal and external pH effects on the voltage dependence of the rate of inactivation, Ca^{2+} records were obtained at different potentials and their time constants of inactivation (τ_h) were measured. The results are shown in Fig. 14 B. Data points corresponding to pH_o 8.1 were plotted with a 5-mV shift in the positive direction to compensate for the negative shift observed in the voltage dependence of the channels. As shown earlier (Santi et al., 1996), τ_h decreases markedly with depolarization, showing a strong voltage dependence in the voltage range between -45 and 0 mV. In the group of control cells, τ_h showed an ϵ -fold reduction per 6.18 mV. This value was 6.86 mV for cells recorded in external medium at pH 8.1 and 10.77 mV for cells recorded with a pipette internal solution at pH 8.1. At -40 mV, the inactivation time constant of cells recorded in both external and internal alkaline solutions was significantly faster than under control conditions: 15.07 ± 1.19 ms (mean \pm SEM, $n = 8$, pH_o 8.1) and 14.57 ± 0.47 ms (mean \pm SEM, $n = 13$, pH_i 8.1) vs. 20.19 ± 3.12 ms (mean \pm SEM, $n = 8$, control). Nevertheless, they became virtually identical at potentials positive to -30 mV regardless of the pH (see Fig. 14 B). This finding is further illustrated in Fig. 14 C, where current traces obtained at the peak of the three I-V curves shown in Fig. 14 A were normalized. The traces virtually superimpose onto one another. The main conclusion from this group of experiments is that the kinetics of activation and inactivation of Ca^{2+} currents are not affected to a large extent by alkalization of either side of the channel. Thus, our data do not support the notion that, upon elevation of pH_i , the properties of T-type Ca^{2+} channels change so much as to allow sustained Ca^{2+} influx.

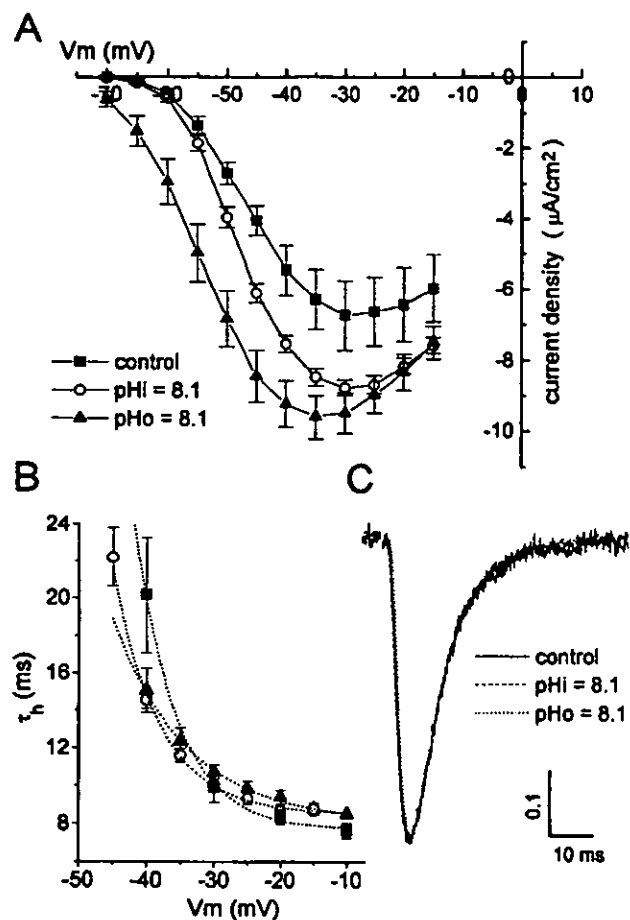


FIGURE 14. Effects of pH on current to voltage relationship of Ca^{2+} currents in primary spermatocytes. (A) Peak I-V relationship recorded from spermatocytes in control conditions and after increasing either internal or external pH to 8.1. (■) pH_i 7.4, (○) pH_i 8.1, (▲) pH_o 8.1. When the external pH changed from 7.3 to 8.1, the peak current density increased significantly and the I-V curve shifted 5 mV in the hyperpolarizing direction. Conversely, intracellular alkalization increased peak current density without affecting the voltage dependence of the channels. (B) Voltage dependence of the time constant of inactivation (τ_h) of the decay of Ca^{2+} currents recorded under the three conditions shown in A. Dotted lines represent exponential fits to the data points. (C) Ca^{2+} current traces obtained at the peak of the I-V curves under control conditions (continuous trace) and after external (dotted trace) or internal (dashed trace) alkalization to pH 8.1. Traces were normalized to their peak amplitude and superimposed for comparison. Notice that activation and inactivation kinetics of Ca^{2+} currents is not affected by alkalization of either side of the channel.

DISCUSSION

Intracellular pH can influence a wide variety of cellular processes (Putnam, 1995). In the adluminal compart-

TABLE I
Effects of Internal and External Alkalization on Voltage Dependence of Activation and Steady State Inactivation of Ca^{2+} Currents

	$V_{a1/2}$	k_s	$V_{i1/2}$	k_i
	mV		mV	
Control	-43.66 ± 1.6	6.48 ± 0.23	-61.0 ± 2.18	5.4 ± 0.7
pH_i 8.1	-43.94 ± 0.6	6.32 ± 0.1	-58.08 ± 0.8	4.19 ± 0.27
pH_o 8.1	-48.5 ± 1.15	7.35 ± 0.3	-60.84 ± 0.96	5.08 ± 0.43

ment of seminiferous tubules, spermatogenic cells grow and differentiate in close contact and under the influence of Sertoli cells (reviewed in Jegou, 1993). Some aspects of these processes are sensitive to pH_i (Boron, 1986; Moolenaar, 1986), which is well regulated by spermatogenic cells (Osses et al., 1997). It is well established that in various systems increases in pH_i can elevate $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Thus, one mechanism by which pH_i changes may affect differentiation is by modulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In addition, elevations of pH_i modulate sperm flagellar motility in many species (Shapiro et al., 1990; Darszon et al., 1996) are required for capacitation in mammalian sperm (Meizel and Deamer, 1978; Working and Meizel, 1983; Vredenburg and Parrish, 1995; Zeng et al., 1996) and are involved in acrosomal exocytosis in a diversity of organisms (reviewed in Darszon et al., 1996).

The information stated above suggests that a pH_i -modulated Ca^{2+} permeability pathway participates both in spermatogenesis and in sperm physiology. Since sperm are terminal cells, their ion transport systems are synthesized during spermatogenesis (Hetch, 1988). Therefore, late spermatocytes and spermatids, interesting in their own right, are good models to study the properties and regulation of ion transport systems that will be present in mature sperm (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996). The present experiments were conducted to evaluate the influence of intracellular alkalinization on the Ca^{2+} levels in spermatogenic cells isolated from the testes of adult mice. Our results indicate that cytosolic alkalinization elicited by exposure to the cell-permeant weak base NH_4Cl increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mainly by opening a plasmalemmal Ca^{2+} influx pathway. The magnitude of this response increases gradually as maturation advances, suggesting a possible role in the physiology of mature sperm. This Ca^{2+} permeation pathway allows the passage of Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Mn^{2+} and is blocked by inorganic Ca^{2+} channel blockers Ni^{2+} and Cd^{2+} , but not by nifedipine. It is likely that, if present in mature sperm, this pH_i -regulated Ca^{2+} pathway may contribute, perhaps in concert with voltage-gated Ca^{2+} channels, to capacitation and the sustained Ca^{2+} influx required to initiate the AR.

Cytosolic pH might influence resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of spermatogenic cells by way of several mechanisms. The following discussion assumes that the Ca^{2+} permeation pathway constitutes a single, elementary mechanism. Clearly, the interpretation of our results would be different if several pH-dependent processes contribute to the response.

Can pH_i Effects on Intracellular Ca²⁺ Stores Explain the Ca²⁺ Transient?

It is conceivable that upon intracellular alkalinization Ca^{2+} is released from intracellular reservoirs of spermatogenic cells. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and $[^3\text{H}]$ ryanodine binding is pH-sensitive, with an optimal pH in

the alkaline range (>7.2 ; Meissner, 1994). Similarly, pH elevations enhance the rate of IP_3 -induced Ca^{2+} release in skinned smooth muscle cells (Tsukioka et al., 1994). However, as shown in this study, the major source of Ca^{2+} mobilization induced by cytosolic alkalinization is plasmalemmal Ca^{2+} influx, with little or no apparent direct contribution from internal sources. In a related study (Treviño et al., 1998), we examined the density and spatial distribution of Ca^{2+} stores in primary spermatocytes and spermatids using confocal microscopy and fluorescent derivatives of thapsigargin and ryanodine. Both fluorescent analogs showed sparse but distinct labeling of endoplasmic reticulum cisternae, nuclear membrane, and Golgi complex. The scant labeling agrees with the apparently poor Ca^{2+} release that can be induced pharmacologically, suggesting that perhaps the abundance of Ca^{2+} stores is the limiting factor, rather than their filling status. These findings indicate that the amount of Ca^{2+} available for release from rapidly exchanging intracellular reservoirs in spermatogenic cells is too small to directly contribute to the Ca^{2+} signal induced by cytosolic alkalinization. Also, these results, especially those obtained with thapsigargin and cyclopiazonic acid, rule out a major role of Ca^{2+} -ATPase of endoplasmic reticulum in the generation of alkalinization-induced Ca^{2+} transients.

Proton Modulation of Plasmalemmal Voltage-gated Ca²⁺ Currents of Spermatogenic Cells

Hydrogen ions are important physiological regulators of ion flux through voltage-gated Ca^{2+} channels. As established by numerous studies, proton concentration on either side of the channel modulates L-type Ca^{2+} currents (Kaibara and Kameyama, 1988; Krafte and Kass, 1988; Klockner and Isenberg, 1994). By comparison, very little information is available on the pH modulation of T-type channels, the class of voltage-gated Ca^{2+} channels present in spermatogenic cells. In heart cells, Tytgat et al. (1990) found that external acidification reduces currents carried by T-type Ca^{2+} channels, while alkalinization enlarges them. Thus, raising pH_o from 7.4 to 8.0 increased both peak current density and maximum conductance (g_{max}) twofold. Furthermore, both the peak of the I-V curve and the half-maximal activation parameter shifted 5 mV negatively. Conversely, T-type Ca^{2+} channels were not significantly modulated by internal changes in pH in the range 6.5–8.0.

Our results with spermatogenic cells are in almost perfect agreement with those obtained in heart cells regarding external pH regulation. Also, cytosolic alkalinization slightly increased peak Ca^{2+} current density without affecting the voltage dependence of the channels. It has been shown that T-type Ca^{2+} current modulation is due to (a) titration of fixed surface charges near the channels, and (b) changes both in single chan-

nel conductance and probability of the channel being open (Tytgat et al., 1990). Given the remarkable similarities in the pH dependence of the T-type currents in heart and spermatogenic cells, it is likely that the same mechanisms are involved, although this conclusion awaits experimental confirmation. Experiments in mutated L-type Ca^{2+} channels indicate that external protons block the channel by interacting with a site along the permeation pathway rather than at an external regulatory site outside the pore (Chen et al., 1996). Since the protonation site lies within the pore, and the crucial P-region glutamates in repeats I, II, and III are perfectly conserved in all known α_1 Ca^{2+} channel subunits, it is likely that the same molecular basis underlies the pH sensitivity of T-type Ca^{2+} channels.

Can pH_i Effects on Voltage-gated Ca^{2+} Channels Explain the Ca^{2+} Transient?

Our results indicate that upon internal alkalinization both voltage dependence and kinetics of the Ca^{2+} channels remain virtually unaltered. The mild increase in peak Ca^{2+} current density upon cytosolic alkalinization could slightly augment the capability of this pathway to contribute to a sustained $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. However, external alkalinization is expected to have more repercussion, not only because it increases more Ca^{2+} current density, but also because it shifts the activation threshold to more negative potentials. In this regard, it should be stressed that, in cardiac cells, the external pH-induced changes in g_{max} showed an apparent pK_a in the range 7.1–7.5 for T-type Ca^{2+} channels, while L-type Ca^{2+} channels of the same cells had a more acidic apparent $\text{pK}_a \sim 5.2$. This difference implies that near the physiological pH, T-type Ca^{2+} channels are much more sensitive to variations in external pH than L-type Ca^{2+} channels. This divergence may be crucial in sperm, given the substantial environmental pH changes it experiences through the epididymis and during its journey along the female genital tract.

These findings, together with the inability of nifedipine to significantly inhibit alkalinization-induced Ca^{2+} transients, make unlikely that voltage-gated Ca^{2+} channels constitute a major component of the permeation pathway made available by internal alkalinization. Regardless of this conclusion, T-type Ca^{2+} channels, if present in sperm, are likely to participate in the Ca^{2+} influx required to initiate the acrosome reaction (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996).

Can pH_i Effects on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger Explain the Ca^{2+} Transient?

It has been shown that $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange is extremely sensitive to cytoplasmic pH, particularly in the physiological range. The activity of the exchanger is partially inhibited at physiological pH, is completely in-

hibited below pH 6.0, and is maximal at pH 9.0 (Doering and Lederer, 1993; Doering et al., 1996). Although external and internal pH have opposite effects on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, its activity is about three times more sensitive to changes in pH_i than to changes in pH_o (Doering et al., 1996). Thus, under physiological conditions, where external pH changes may result in parallel pH_i changes, the inhibitory effect of H^+ is expected to dominate. Plasmalemmal Ca^{2+} influx carried by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange is possible under its "reverse" mode of operation (Na^+ -dependent Ca^{2+} influx). This occurs when membrane potential becomes more positive than the equilibrium potential of the exchanger, $E_{\text{Na}/\text{Ca}}$. The resting membrane potential of rat spermatis in suspension has been estimated using a membrane potential sensitive dye (-22 mV; Reyes et al., 1994). The equilibrium potential of the exchanger in spermatogenic cells is not known. Nevertheless, since the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ remains low and invariant for extended periods of observation (this study), it is probably safe to assume that the cell's resting potential is more negative than the exchanger's reversal potential. It could be argued that $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange may participate in the alkalinization-induced Ca^{2+} influx based on the following similarities: (a) the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ activity increases upon cytosolic alkalinization (see above); (b) Sr^{2+} and Ba^{2+} can also be transported by the exchanger, thus allowing these divalents to enter the cell (Tibbits and Philipson, 1985; Condrescu et al., 1997); (c) Ni^{2+} inhibits the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger at low millimolar concentrations, but not nifedipine (Trospen and Philipson, 1983); and (d) monensin, which enhances alkalinization-induced responses, also stimulates the reverse mode of operation of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by increasing $[\text{Na}^+]_i$ (Santi et al., 1995).

In spite of these similarities, alkalinization-induced Ca^{2+} entry differs from $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in several crucial aspects. First, the former readily allows Mn^{2+} influx, while the exchanger cannot transport this divalent (Trospen and Philipson, 1983). Furthermore, superfusion with $10 \mu\text{M}$ 2,4-dichlorobenzamil, a relatively specific inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, does not suppress alkalinization-induced Ca^{2+} transients (data not shown). Finally, ouabain ($50 \mu\text{M}$) does not enhance alkalinization-induced Ca^{2+} transients even though, like monensin, it increases $[\text{Na}^+]_i$ by inhibiting the Na^+/K^+ -ATPase (data not shown). These findings are inconsistent with a significant participation of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the pH-dependent Ca^{2+} entry of spermatogenic cells.

Can Effects on other Ca^{2+} Entry Pathways Account for the Alkalinization-induced Ca^{2+} Transient?

In nonexcitable cells, intracellular calcium release is followed by a sustained "store-operated Ca^{2+} influx"

(Putney, 1986, 1997; reviewed in Parekh and Penner, 1997). The associated inward currents, termed I_{CRAC} (calcium-release activated currents) or I_{SOC} (store operated channel) are highly selective for Ca^{2+} over monovalents (Hoth and Penner, 1993; Yao and Tsien, 1997). Another calcium entry pathway, clearly distinct from I_{CRAC} exists in some cell types (Putney, 1997), and could correspond to $InsP_3$ receptors present in the plasma membrane (Vaca and Kunze, 1995). The properties of these Ca^{2+} entry mechanisms resemble those of the alkalization-induced Ca^{2+} influx pathway: I_{CRAC} and I_{SOC} display high selectivity for Ca^{2+} ions, although other divalents, such as Ba^{2+} and Sr^{2+} , are also permeant (Hoth and Penner, 1993; Yao and Tsien, 1997). Ni^{2+} and Cd^{2+} block both currents (Premack et al., 1994; Zweifach and Lewis, 1993; Yao and Tsien, 1997). Similarly, the $InsP_3$ -induced permeation across the plasma membrane of Jurkat T cells has relative cation conductances $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$, and La^{3+} and Cd^{2+} have been used as nonspecific blockers of $InsP_3$ receptors. Both I_{CRAC} and $InsP_3$ receptors, although Ca^{2+} selective, allow the passage of Mn^{2+} (Fasolato et al., 1993; Hoth and Penner, 1993; Premack et al., 1994; Zweifach and Lewis, 1993). Interestingly, pH is an important modulator of the activity of both mechanisms (Tsukioka et al., 1994; Iwasawa et al., 1997).

As shown earlier, Ca^{2+} release from internal stores does not play a major role in directly generating the alkalization-induced Ca^{2+} transients in spermatogenic cells, probably because their Ca^{2+} stores are not very abundant. Nonetheless, these findings do not rule out the possibility that pH-induced depletion of Ca^{2+} stores may lead to opening of SOCs. Since the activity of this Ca^{2+} influx pathway is itself regulated by intracellular pH, it is conceivable that it could participate or even be responsible for the alkalization-induced Ca^{2+} rise.

The expression of SOCs in spermatogenic cells has not been thoroughly examined. Nevertheless, the experiments shown in Fig. 9 E, and particularly those in Fig. 10, are consistent with the presence of such channels. The slow and sustained Ca^{2+} influx observed upon the readmission of external Ca^{2+} after thapsigargin application indicates that spermatogenic cells contain thapsigargin-sensitive sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. The absence of a significant Ca^{2+} rise during thapsigargin application could be due to the presence of a mechanism that extrudes Ca^{2+} as quickly as it is released. Secondly, these experiments strongly suggest that spermatogenic cells express SOCs. It remains to be explored if this Ca^{2+} permeation pathway is responsible for the alkalization-induced Ca^{2+} entry. Alternatively, this route could represent a novel pH-regulated channel, predominantly expressed in late spermatogenic cells, not unlike Slo3, a novel potassium channel abundantly expressed in mammalian sperma-

toocytes and regulated by both intracellular pH and membrane voltage (Schreiber et al., 1998).

Possible Functional Significance of the Alkalization-induced Ca^{2+} Transients in Mature Sperm Physiology

As shown here, testicular sperm undergo large $[Ca^{2+}]_i$ increases when exposed to NH_4Cl . In this regard, it is worth considering how a pH-dependent Ca^{2+} permeability pathway could influence sperm physiology.

Sperm travel through very different environments in an excursion that lasts many days from the seminiferous tubules to the oviduct. Clearly, environmental changes, pH_o among them, can influence their physiological state and rate of survival. These changes select the fittest sperm and induce the maturation processes required to achieve fertilization at the appropriate site (reviewed in Harper, 1988; Setchell and Brooks, 1988). In this context, it is not difficult to imagine that the pH-dependent Ca^{2+} permeability pathway described here, along with T-type Ca^{2+} channels, which are also sensitive to external pH, may modulate $[Ca^{2+}]_i$, thus influencing sperm function along the tortuous path towards the egg.

Before they can acquire the capacity to fertilize the egg, sperm need to become capacitated, a process that involves a series of ill defined functional and biophysical modifications (Florman and Babcock, 1991; Baldi et al., 1996). An obligatory step during *in vitro* capacitation is internal alkalization from pH ~ 6.5 to 6.7 (Parish et al., 1989; Zeng et al., 1996; reviewed in Baldi et al., 1996). Interestingly, this is the same range of pH change required for spermatogenic cells to respond to alkalization with Ca^{2+} rises. It can be speculated that the "pH threshold" phenomenon, along with the use-dependent facilitation here described, is relevant for the mechanism of capacitation by allowing cells to respond more vigorously to subsequent episodes of intracellular alkalization.

Several models exist to explain the sperm AR, a Ca^{2+} -dependent exocytotic event required for fertilization, but the precise order of events and the molecular identity of the participants remains elusive (Arnoult et al., 1996a; Darszon et al., 1996). In a striking similarity to sea urchin sperm (Guerrero and Darszon, 1989a, 1989b), at least two different Ca^{2+} channels are believed to participate in the mammalian sperm AR (Florman, 1994; Tiwari-Woodruff et al., 1995). It has been proposed (Arnoult et al., 1996a) that a cation channel that allows Ca^{2+} influx depolarizes the spermatozoon, thus opening T-type Ca^{2+} channels (Arnoult et al., 1996b; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996). The ensuing Ca^{2+} rise, together with the pH_i increase, would trigger the AR. One problem with this model is that Ca^{2+} channels only activate transiently, thus precluding

sustained $[Ca^{2+}]_i$ elevations. As shown here, this shortcoming of the voltage-gated pathway is not lessened by internal alkalization. On the other hand, the pH_i -regulated Ca^{2+} pathway described here appears more suitable for supporting sustained Ca^{2+} elevations.

Sperm are devoted to the generation of a new individual. An exquisitely choreographed signaling cascade

is required to reach this goal, which may use specific ion-transport variations not evident in other cell types. This novel pH -dependent Ca^{2+} permeation pathway, assuming its presence in mature sperm, could be one of the ion-transport variations responsible for the dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} influx that precedes and triggers the acrosome reaction.

The authors thank Drs. Agustín Guerrero and Javier Alvarez-Leefmans for many useful discussions, and Drs. Larry Salkoff and Luis Vaca for reviewing an earlier version of this manuscript. Dr. Reinaldo Dipolo made many helpful suggestions in the early stages of this project. We also thank Dr. José Luis Molinari for providing healthy mice from his colony and Nicolás Jiménez for help in conducting some experiments.

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN206395, IN204497) and CONACyT (2566PN, 25261-N; México) to A. Hernández-Cruz, and by the Howard Hughes Medical Institute and the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology to A. Darszon. This work was conducted by C.M. Santi in partial fulfillment of her Ph.D. Thesis. For that purpose, she was awarded a Ph.D. fellowship from DGAPA-UNAM.

Original version received 8 April 1998 and accepted version received 7 May 1998.

REFERENCES

- Arnoult, C., Y. Zeng, and H.M. Florman. 1996a. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* 134:637-645.
- Arnoult, C., R.A. Cardullo, J.R. Lemos, and H.M. Florman. 1996b. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13004-13009.
- Arnoult, C., J.R. Lemos, and H.M. Florman. 1997. Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16:1593-1599.
- Babcock, D.F., and D.R. Pfeiffer. 1987. Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ and pH of mammalian sperm by voltage dependent and pH-sensitive mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262:15041-15047.
- Baldi, E., L. Michaela, L. Bonaccorsi, C. Krausz, and G. Forti. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Front. Biosci.* 1:189-205.
- Battle, D., C.R. Peces, M.S. LaPointe, M. Ye, and J.T. Daugirdas. 1993. Cytosolic free calcium regulation in response to acute changes in intracellular pH in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 264:C932-C943.
- Bellvé, A.R., C.F. Millette, Y.M. Bhatnagar, and D.A. O'Brien. 1977. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25:480-494.
- Beltrán, C., O. Zapata, and A. Darszon. 1996. Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylcyclase. *Biochemistry.* 35:7591-7598.
- Benning, N., J. Leipsinger, R. Greger, and R. Nitschke. 1996. Effects of alkalization of cytosolic pH by amines on intracellular Ca^{2+} activity in HT29 cells. *Pflügers Arch.* 432:126-133.
- Bevensee, M.O., and W.F. Boron. 1995. Manipulation and regulation of cytosolic pH. *In Methods in Neurosciences.* Vol. 27. Academic Press Inc., Orlando, FL. 252-272.
- Boron, W.F. 1986. Special topic: acid/base physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 48:347-413.
- Chen, X.-H., I. Bezprozvanny, and R.W. Tsien. 1996. Molecular basis for proton block of L-type Ca^{2+} channels. *J. Gen. Physiol.* 108:363-374.
- Condrescu, M., G. Chernaya, V. Kalaria, and J.P. Reeves. 1997. Barium influx mediated by the cardiac sodium-calcium exchanger in transfected chinese hamster ovary cells. *J. Gen. Physiol.* 109:41-51.
- Danthuluri, N.R., D. Kim, and T.A. Brock. 1990. Intracellular alkalization leads to Ca^{2+} mobilization from agonist-sensitive pools in bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265:19071-19076.
- Darszon, A., A. Liévano, and C. Beltrán. 1996. Ion channels: key elements in gamete signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 34:117-167.
- Dickens, C.J., J.I. Gillespie, J.R. Greenwell, and P. Hutchinson. 1990. Relationship between intracellular pH (pH_i) and calcium (Ca^{2+})_i in avian heart fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 187:39-46.
- Doering, A.E., and W.J. Lederer. 1993. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J. Physiol. (Camb.)* 466:481-499.
- Doering, A.E., D.A. Eisner, and W.J. Lederer. 1996. Cardiac Na-Ca exchange and pH. *Ann. NY Acad. Sci.* 779:182-198.
- Fasolato, C., M. Hoth, and R. Penner. 1993. Multiple mechanisms of manganese-induced quenching of fura-2 fluorescence in rat mast cells. *Pflügers Arch.* 423:225-231.
- Florman, H.M., R.M. Tombes, N.L. First, and D.F. Babcock. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 135:133-146.
- Florman, H.M., and D.F. Babcock. 1991. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. *In Elements of Mammalian Fertilization. I. Basic concepts.* P.M. Wassermann, editor. CRC Press, Boca Raton, FL. 105-132.
- Florman, H.M., M.E. Corron, T.D.-H. Kim, and D.F. Babcock. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 152:304-314.
- Florman, H.M. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 165:152-164.
- Gabers, D.L. 1989. Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58:719-742.
- García-Soto, J., M. González-Martínez, L. De la Torre, and A. Darszon. 1987. Internal pH can regulate Ca^{2+} uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 120:112-120.
- Grinstein, S., and J.D. Goetz. 1985. Control of free cytoplasmic calcium by intracellular pH in rat lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 819:267-270.
- Gryniewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation

- of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- Guerrero, A., and A. Darszon. 1989a. Egg jelly triggers a calcium influx which inactivates and is inhibited by calmodulin antagonists in the sea urchin sperm. *Biochim. Biophys. Acta.* 980:109-116.
- Guerrero, A., and A. Darszon. 1989b. Evidence for the activation of two different Ca^{2+} channels during the egg jelly induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 264:19593-19599.
- Harper, M.J.K. 1988. Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. E. Knobil and J.D. Neill, editors. Raven Press, New York. 103-134.
- Hernández-Cruz, A., A.L. Escobar, and N. Jiménez. 1997. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 109:147-167.
- Hetch, N.B. 1988. Post meiotic gene expression during spermatogenesis. In *Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis*. Vol. 267. F.P. Haseltine and N.L. First, editors. Alan R. Liss, New York. 291 pp.
- Hoth, M., and R. Penner. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol. (Camb.)*. 465:359-386.
- Iwasawa, K., T. Nakajima, H. Hazama, A. Goto, W.-S. Shin, T. Toyooka, and M. Omata. 1997. Effects of extracellular pH on receptor-mediated Ca^{2+} influx in A7r5 rat smooth muscle cells: involvement of two different types of channel. *J. Physiol. (Camb.)*. 503:237-251.
- Jegou, B. 1993. The sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 147:25-96.
- Kaibara, M., and M. Kameyama. 1988. Inhibition of the calcium channel by intracellular protons in single ventricular myocytes of the guinea-pig. *J. Physiol. (Camb.)*. 403:621-640.
- Klockner, U., and G. Isenberg. 1994. Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *J. Gen. Physiol.* 103:665-678.
- Konishi, M., A. Olson, S. Hollingworth, and S.M. Baylor. 1988. Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* 54:1089-1104.
- Krafte, D.S., and R.S. Kass. 1988. Hydrogen ion modulation of Ca^{2+} channels current in cardiac ventricular cells. *J. Gen. Physiol.* 91: 641-657.
- Liévano, A., C.M. Santú, C.J. Serrano, C.L. Treviño, A.R. Bellvé, A. Hernández-Cruz, and A. Darszon. 1996. T-type Ca^{2+} channels and α_{1E} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388:150-154.
- Martínez-Zaguilán, R., G.M. Martínez, F. Lattanzio, and R.J. Gillies. 1991. Simultaneous measurement of intracellular pH and Ca^{2+} using the fluorescence of SNARF-1 and Fura-2. *Am. J. Physiol.* 260: C297-C307.
- Martínez-Zaguilán, R., M.W. Gurulé, and R.M. Lynch. 1996. Simultaneous measurement of intracellular pH and Ca^{2+} in insulin secreting cells by spectral imaging microscopy. *Am. J. Physiol.* 270: C1438-C1446.
- Meissner, G. 1994. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 485-508.
- Meizel, S., and D.W. Deamer. 1978. The pH of the hamster sperm acrosome. *J. Histochem. Cytochem.* 26:98-105.
- Moolenaar, W.H. 1986. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 48:363-376.
- Nitschke, R., A. Riedel, S. Ricken, J. Leipziger, N. Benning, K.-G. Fischer, and R. Greger. 1996. The effect of intracellular pH on cytosolic Ca^{2+} in HT₂₉ cells. *Eur. J. Physiol.* 433:98-108.
- Osses, N., F. Pancetti, D.J. Benos, and J.G. Reyes. 1997. Intracellular pH regulation in rat spermatids. *Biol. Cell.* 89:273-283.
- Parekh, A.B., and R. Penner. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77:901-930.
- Parish, J.J., J.L. Susko-Parish, and N.L. First. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 49:683-699.
- Premack, B.A., T.V. McDonald, and P. Gardner. 1994. Activation of a Ca^{2+} current in Jurkat T cells following the depletion of Ca^{2+} stores by microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitors. *J. Immunol.* 152: 5226-5240.
- Putnam, R.W. 1995. Intracellular pH regulation. In *Cell Physiology*. N.D. Speralakis, editor. Academic Press, New York. 212-229.
- Putney, J.W., Jr. 1986. A model for receptor regulated calcium entry. *Cell Calc.* 7:1-12.
- Putney, J.W., Jr. 1997. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calc.* 21:257-261.
- Reyes, J.G., J. Bacigalupo, R. Araya, and D.J. Benos. 1994. Ion dependence of resting membrane potential of rat spermatids. *J. Reprod. Fert.* 102:313-319.
- Santú, C.M., J.A. Connor, and A. Hernández-Cruz. 1995. A significant fraction of calcium transients in intact guinea pig ventricular myocytes is mediated by Na^{+} - Ca^{2+} exchange. *Cell. Signal.* 7:803-820.
- Santú, C.M., A. Darszon, and A. Hernández-Cruz. 1996. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.* 271: C1583-C1593.
- Setchell, B.P., and D.E. Brooks. 1988. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. E. Knobil and J.D. Neill, editors. Raven Press, New York. 933-974.
- Schreiber, M., A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito, and L. Salkoff. 1998. Slo3, a novel pH-sensitive K^{+} channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* 273:3509-3516.
- Shapiro, B.M., S. Cook, A.F.G. Quest, J. Oberdorf, and D. Wothe. 1990. Molecular mechanisms of sea urchin-sperm activation before fertilization. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*. 42:3-8.
- Shorte, S.L., G.L. Collingridge, A.D. Randall, J.B. Chappell, and J.C. Schofield. 1991. Ammonium ions mobilize calcium from an internal pool which is sensitive to TRH and ionomycin in bovine anterior pituitary cells. *Cell Calc.* 12:301-312.
- Siskind, M.S., C.E. McCoy, A. Chobanian, and J.H. Schwartz. 1989. Regulation of intracellular calcium by pH in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 256:C234-C240.
- Tajima, Y., N. Okamura, and Y. Sugita. 1987. The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:519.
- Tibbits, G.F., and K.D. Philipson. 1985. Na^{+} -dependent alkaline earth metal uptake in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 817:327-332.
- Tiwari-Woodruff, S.K., and T.C. Cox. 1995. Boar sperm plasma membrane Ca^{2+} -selective channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 265:C1284-C1294.
- Treviño, C.L., C.M. Santú, C. Beltrán, A. Hernández-Cruz, A. Darszon, and H. Lomelí. 1998. Localization of IP_3 and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote*. In press.
- Trimmer, J.S., and V.D. Vacquier. 1986. Activation of sea urchin gametes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2:1-26.
- Trosper, T.L., and K.D. Philipson. 1983. Effects of divalent and trivalent cations on Na^{+} / Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 731:63-68.
- Tsukioka, M., M. Iino, and M. Endo. 1994. pH dependence of inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. *J. Physiol. (Camb.)*. 475: 369-375.
- Tytgat, J., B. Nilius, and E. Carmeliet. 1990. Modulation of T-type

- cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J. Gen. Physiol.* 96:973-990.
- Vaca, L., and D.L. Kunze. 1995. IP₃-activated Ca²⁺ channels in the plasma membrane of cultured vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 269:C733-C738.
- Vredenburgh, W.L., and J.J. Parrish. 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 490-502.
- Wiegmann, T.B., L.W. Welling, D.M. Beaty, D.E. Howard, S. Vamos, and S.J. Morris. 1993. Simultaneous imaging of intracellular [Ca²⁺]_i and pH in single MDCK and glomerular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 265:C1184-C1190.
- Working, P.K., and S. Meizel. 1983. Correlation of increased intracrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 227:97-107.
- Yao, Y., and R.Y. Tsien. 1997. Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 109:703-715.
- Yodozawa, S., T. Speake, and A. Elliott. 1997. Intracellular alkalization mobilizes calcium from agonist-sensitive pools in rat lacrimal acinar cells. *J. Physiol. (Camb.)* 499:601-611.
- Zeng, Y., J.A. Oberdorf, and H.M. Florman. 1996. pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁺, Cl⁻, and HCO₃⁻-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev. Biol.* 173:510-520.
- Zweifach, A., and R.S. Lewis. 1993. Mitogen-regulated Ca²⁺ current in T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6295-6299.

A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes

CELIA M. SANTI, ALBERTO DARSZON, AND ARTURO HERNÁNDEZ-CRUZ

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,

Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510; and Instituto

de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Santi, Celia M., Alberto Darszon, and Arturo Hernández-Cruz. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.* 271 (*Cell Physiol.* 40): C1583–C1593, 1996.— Ca^{2+} entry through Ca^{2+} channels is likely to play an important role in the differentiation of male germ cells as well as in fertilization by mature sperm. Here we present a detailed analysis of Ca^{2+} currents expressed in acutely dissociated mouse primary spermatocytes. Patch-clamp recordings demonstrated that the only voltage-gated Ca^{2+} channels present belong to the family of T-type Ca^{2+} currents. Accordingly, Ni^{2+} (200 μM) and amiloride (500 μM) reduced current amplitude by 75 and 62%, respectively. To our knowledge, this is the first report of a system where T-type Ca^{2+} channels are expressed in isolation. Unexpectedly, 5 and 10 μM nifedipine also reduced peak currents by 38 and 53%, respectively. Significant inhibition of the Ca^{2+} current occurred at concentrations as low as 2 μM . Because mature sperm cells are unable to synthesize new proteins, these Ca^{2+} channels are also likely to be present in these cells, where they may contribute to the Ca^{2+} influx required to trigger the acrosome reaction. This notion is supported by the fact that concentrations of Ni^{2+} and nifedipine, which block these Ca^{2+} currents, also inhibit the acrosome reaction. Because these channels represent the primary pathway for voltage-gated Ca^{2+} entry in mouse spermatocytes, they may also participate in regulating meiotic cell division and sperm differentiation.

calcium currents; spermatogenesis; patch clamp; germ cell physiology

CALCIUM CURRENTS in mammalian cells serve two main purposes: 1) to contribute to the generation of regenerative electrical signals in excitable tissues and 2) to allow regulated Ca^{2+} influx and contribute to the production of intracellular Ca^{2+} signals crucial for many physiological processes (3, 21). Voltage-gated Ca^{2+} channels present in nonexcitable cells mainly participate in this Ca^{2+} -signaling function.

Indirect evidence suggests that, in sperm cells, voltage-gated Ca^{2+} channels can mediate transmembrane Ca^{2+} influx, which regulates important metabolic processes and triggers the acrosome reaction (2, 13, 14, 42). The activity of Ca^{2+} -permeable channels present in mammalian sperm membranes has been recorded in lipid bilayers (5, 28, 40). However, the properties of these channels are markedly different from those of typical plasmalemmal voltage-gated Ca^{2+} channels (3). More direct approaches to study ion channels in sperm cells, such as patch-clamp recording of membrane currents, have been hampered by their very small size (<5 μm). At present, very little is known about the

kinetic properties of voltage-gated Ca^{2+} channels of mature sperm cells (see Ref. 11).

We have approached the study of ion channels in mature sperm by recording membrane currents from their immediate precursors during spermatogenesis. The rationale for this approach is that, since mature sperm lack the competence to synthesize new proteins (22), the biogenesis of their ion channels must occur in spermiogenesis or perhaps during spermatogenesis. Our tentative hypothesis is that ion channels expressed during late spermatogenesis persist in mature sperm, where they could play important physiological roles. Furthermore, the study of membrane currents present in spermatogenic cells constitutes an interesting subject in its own right, since little is known about the participation of ion channels in mammalian sperm differentiation and maturation.

Here we examined the kinetic properties of Ca^{2+} currents present in acutely dissociated germ cells from an advanced stage of maturation (primary spermatocytes in pachytene stage). We also tested several proposed specific blockers of the T-type Ca^{2+} current, as well as others selective for the noninactivating Ca^{2+} currents with higher threshold for activation, the L-type Ca^{2+} channels.

On the basis of voltage dependence, kinetics, inactivation behavior, and pharmacological sensitivity, we concluded that spermatogenic cells possess a single class of voltage-gated Ca^{2+} channels. The properties of these channels are consistent with a type of low-voltage-activated Ca^{2+} channel that requires membrane hyperpolarization to remove inactivation and activates with small depolarizations. Because these T-type Ca^{2+} channels are the primary pathway for voltage-gated Ca^{2+} entry in spermatogenic cells, they could play a significant physiological role in regulating the unique processes of meiotic cell division and sperm differentiation. If present in mature sperm, these Ca^{2+} channels could be key elements in fertilization, by contributing to the Ca^{2+} influx necessary to initiate the acrosome reaction.

MATERIALS AND METHODS

Dissociation procedure. Spermatogenic cells were obtained with a procedure similar to that described by Bellvé et al. (4). Briefly, adult male mice >90 days of age were anesthetized with ether and then killed by cervical dislocation. Their testes were removed and placed in ice-cold saline. Decapsulated testes were washed and incubated for 15 min at 28°C in Ca^{2+} -free saline containing 1 mg/ml collagenase type I (Sigma Chemical, St. Louis, MO) plus 0.4 mg/ml deoxyribonuclease type I (Sigma; pH 7.35). Isolated seminiferous tubules were incubated for another 10 min in Ca^{2+} -free saline containing 0.4 mg/ml trypsin (Worthington Biochemical, Freehold, NJ).

Thereafter, tubules were washed twice with Ca²⁺-free solution, to which 1% bovine serum albumin was added, and were mechanically dissociated in Ca²⁺-free solution. Cells remained healthy for up to 12 h when stored at 4–10°C. An aliquot of the cell suspension was placed in a Plexiglas recording chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD; Nikon). Once the cells attached to the glass bottom of the chamber, they were continuously superfused with recording medium (see *Patch-clamp recordings*).

Cell identification. Most of the cells obtained by dissociation of seminiferous tubules were at advanced stages of spermatogenesis. Adult testes contain a very low proportion of both spermatogonia and Sertoli cells (4). During dissociation of seminiferous tubules, the cytoplasmic bridges connecting adjoining cells are ruptured. Occasionally, these cytoplasmic bridges do not break up but instead they dilate, allowing the confluence of two or more cells. These multinuclear cells, called synplasts, are formed by the fusion of cells from the same stage of spermatogenesis (4). Spermatid synplasts are regularly seen in our cell preparation as well. They are easily recognized under phase contrast by their round and pale nuclei and by the presence of a distinct nucleolus.

Cells in the pachytene stage of maturation are the largest germ cells found in adult testis (>16 μm in diameter), and they possess a distinct condensed nuclear chromatin. These nuclear features can be more easily recognized under epifluorescence, after staining of chromatin with the vital dye Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR). Chromatin staining was achieved by incubating the cells for 10 min in the presence of the dye (final concentration 1 μg/ml). After washout of the dye, cells were illuminated with excitation light of 380 nm, and emission light was band passed at 510 nm. Figure 1 illustrates micrographs of freshly dissociated

pachytene spermatocytes (two single cells and one synplast), viewed under both phase contrast and epifluorescence.

Patch-clamp recordings. Currents were recorded using the whole cell patch-clamp technique. An Axopatch 1-D amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) was connected to the pipette by an Ag-AgCl wire, and the bath was grounded with an Ag-AgCl pellet. Recording medium contained the following (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 Na-N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 glucose, and 10 CaCl₂, pH 7.35. The composition of the pipette internal solution was (in mM): 110 cesium methanesulfonate, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 4 Mg²⁺-ATP, 10 phosphocreatine, and 5 Cs-HEPES. The liquid junction potentials between these solutions was <5 mV (pipette potential negative against bath). Voltages were not corrected for this error, which does not affect the conclusions of this study. Internal Cs⁺ by itself effectively blocked the majority of outward K⁺ currents. Control experiments showed that the properties of Ca²⁺ currents were not affected by the low F⁻ concentration used in these experiments (data not shown). Open-tip pipettes had resistances ranging between 2 and 5 MΩ when filled with pipette solution. Records were filtered (4-pole Bessel filter, band pass 2 kHz), digitized, and stored. Experiments were conducted at room temperature (20–23°C). Seal resistances before rupturing the patch were not determined routinely. After series resistance compensation to >50%, input resistances of these cells, measured from a holding potential of –80 mV, were 792 ± 0.08 (SE) MΩ, n = 12 (see also Refs. 18 and 35).

Pulse generation, data acquisition, and analysis were done with an AT-486/50 MHz computer governed by the pCLAMP

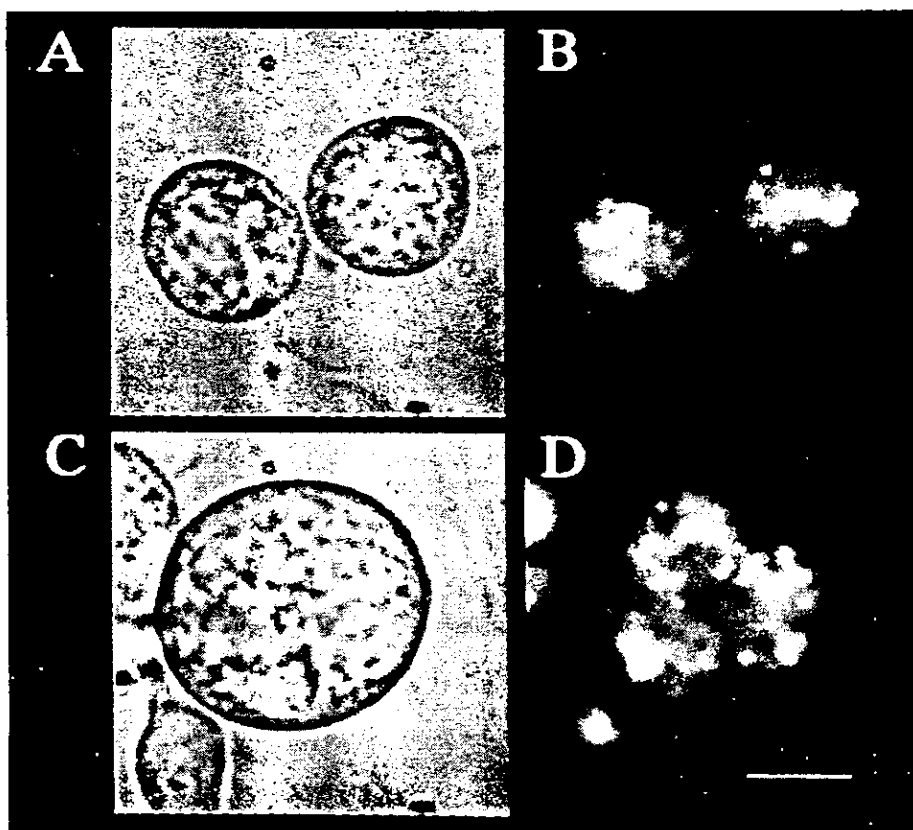


Fig. 1. Micrographs of living acutely isolated mouse spermatogenic cells in pachytene stage of maturation obtained under phase contrast and epifluorescence. A and B: 2 single primary spermatocytes. C and D: synplast resulting from fusion of 3 such cells. Calibration bar, 10 μm.

program suite (Axon Instruments). Pipette capacitive currents were compensated before rupturing the patch. Once in the whole cell configuration, a holding potential of -80 mV was established, and series resistance was electronically compensated by at least 50%. Thereafter, currents elicited by brief 20-mV depolarizing pulses were averaged. These records were used to determine cell capacitance by digital integration of capacitive transients. Only cells exhibiting adequate voltage control [judged by a smoothly rising current-voltage (I - V) relationship and monoexponential decay of capacitive currents] were included in the analysis. Standard pulse protocols for the I - V relationship and steady-state inactivation were consistently used. A $p/4$ pulse protocol (in which currents elicited by depolarizing steps were added to those produced by four hyperpolarizing steps $1/4$ the size of the depolarizing step) was routinely used to minimize leak and capacitive currents from current records.

Ca²⁺ current activation and steady-state inactivation. Ca²⁺ current activation curves were elaborated by converting the peak current values from the I - V relationships to conductances using the equation $g_{Ca} = I_{CaP}/(V_m - E_{Ca})$, where I_{CaP} is the peak Ca²⁺ current, V_m the command pulse potential, and E_{Ca} the Ca²⁺ current apparent reversal potential obtained by linear extrapolation of the current values in the ascending portion of the I - V curve. Conductance values were then normalized and fitted to a Boltzmann relation $g/g_{max} = [1 + \exp(-(V - V_{1/2})/k_a)]^{-1}$, where g is the peak conductance, g_{max} is the maximal peak Ca²⁺ conductance, $V_{1/2}$ is the midpoint of the activation curve, and k_a is the activation steepness factor. The steady-state inactivation curve was obtained by eliciting Ca²⁺ currents with a constant 24-ms test depolarization to -20 mV applied at the end of the prepulses to different levels of depolarization. The amplitude of these 200-ms prepulses was varied in 5-mV steps from -110 to -35 mV. An interval of 10 s was allowed between consecutive trials to prevent accumulation of inactivation. I - V curves were constructed by plotting the peak current as a function of the prepulse potential, and steady-state inactivation curves were obtained by normalizing the current values and fitting the data with a Boltzmann equation $I/I_{max} = [1 + \exp((V - V_{1/2})/k_i)]^{-1}$, where I is the peak current, I_{max} is the peak current when the prepulse was -110 mV, V is the prepulse potential, $V_{1/2}$ is the half-inactivation value, and k_i is the inactivation steepness parameter.

Test solutions containing drugs (NiCl₂, nifedipine, amiloride, BAY K 8644, tetrodotoxin) were prepared fresh for each experiment from concentrated stock solutions and added to the recording solution. Concentrated stock solutions were as follows: NiCl₂ (Sigma; 0.5 M in water), nifedipine (Sigma; 20 mM in ethanol), amiloride (Sigma; 500 mM in water), BAY K 8644 (Miles Labs; 10 mM in ethanol), and tetrodotoxin (Sigma; 500 μM in water). When required, NaCl was equimolarly substituted with choline chloride. To investigate the acute effects of the drugs, test solutions were applied under pressure (10 lb/in²) via a puffer pipette located within 200 μm from the cell under examination. Application of test solutions was controlled by the solenoid valve of a Ficospritzer II device (General Valve, Fairfield, NJ).

RESULTS

Characteristics of the inward current present in spermatogenic cells. A family of inward currents obtained from a spermatogenic cell is shown in Fig. 2A. These currents were evoked from a holding potential of -80 mV to voltages between -70 and $+10$ mV. The inward currents were transient, with activation and inactivation

kinetics becoming faster at stronger depolarizations (Fig. 2A). Inactivation time courses could be well fitted with single exponential functions (Fig. 2B). To examine the identity of this inward current, external Ca²⁺ was raised from 2 to 10 mM. This caused about a threefold increase in current amplitude. Ba²⁺ used at the same concentrations permeated almost as efficiently as Ca²⁺ (data not shown; see Ref. 18). The similar efficiency of Ca²⁺ and Ba²⁺ as current carriers is a property of T-type Ca²⁺ channels. Also, the peak amplitude and I - V relationship remained unchanged when external Na⁺ was completely replaced by choline or when tetrodotoxin (1–1.5 μM), a specific blocker of voltage-gated Na⁺ channels, was added to the bath (data not shown).

Figure 2C illustrates an I - V relationship obtained by averaging data from 23 individual cells. The threshold for inward current activation was at about -60 mV, and the peak amplitude occurred between -20 and -30 mV. There was no indication of a second Ca²⁺ current component activated at higher depolarizations (7) in these spermatogenic cells, suggesting that their Ca²⁺ currents result entirely from the activation of low-voltage-activated Ca²⁺ channels.

As mentioned above, recordings were obtained from cells in the pachytene stage, either individual cells or synplasts. Except for their magnitude, currents recorded from synplasts or individual cells were indistinguishable. To establish meaningful comparisons among different cells, we normalized the magnitude of the peak Ca²⁺ current for cell size. Current density was determined by first computing the total cell capacitance (see MATERIALS AND METHODS) and then assuming that 1 μF equals 1 cm² of cell membrane. The mean peak Ca²⁺ current density obtained from 19 cells was 6.5 ± 0.6 (SE) μA/cm². Cell capacitances in our sample of spermatogenic cells ranged from 16.2 to 52.3 pF with a mean of 33.6 ± 2.3 (SE) pF. The small SE found for the entire cell population suggests that single cells and synplasts have similar Ca²⁺ current densities. Ca²⁺ current density in this report differs markedly from the value of 0.6 μA/cm² previously reported for rat spermatogenic cells by Hagiwara and Kawa (18). This 10-fold difference cannot be easily accounted for by the fivefold difference in external Ca²⁺ concentration used (2 mM in Hagiwara's study vs. 10 mM in ours). Perhaps the difference in species (rat vs. mouse) could explain this discrepancy. Patch-clamp recordings were occasionally obtained from spermatid synplasts. These cells possess inward currents with the same characteristics of the Ca²⁺ currents found in pachytene spermatocytes (data not shown).

Kinetics of activation and inactivation. Ca²⁺ currents peak after a few milliseconds and decay rapidly with time courses well fitted by single exponentials (Fig. 2, A and B). With further depolarization, both activation and inactivation rates become faster. To examine the voltage dependence of the kinetic parameters, records were obtained at different potentials, and both the time to peak (t_p) and time constant of inactivation (τ_b) were measured. The t_p is related to the activation time constant (τ_m) of the Ca²⁺ current. Figure 3 shows that

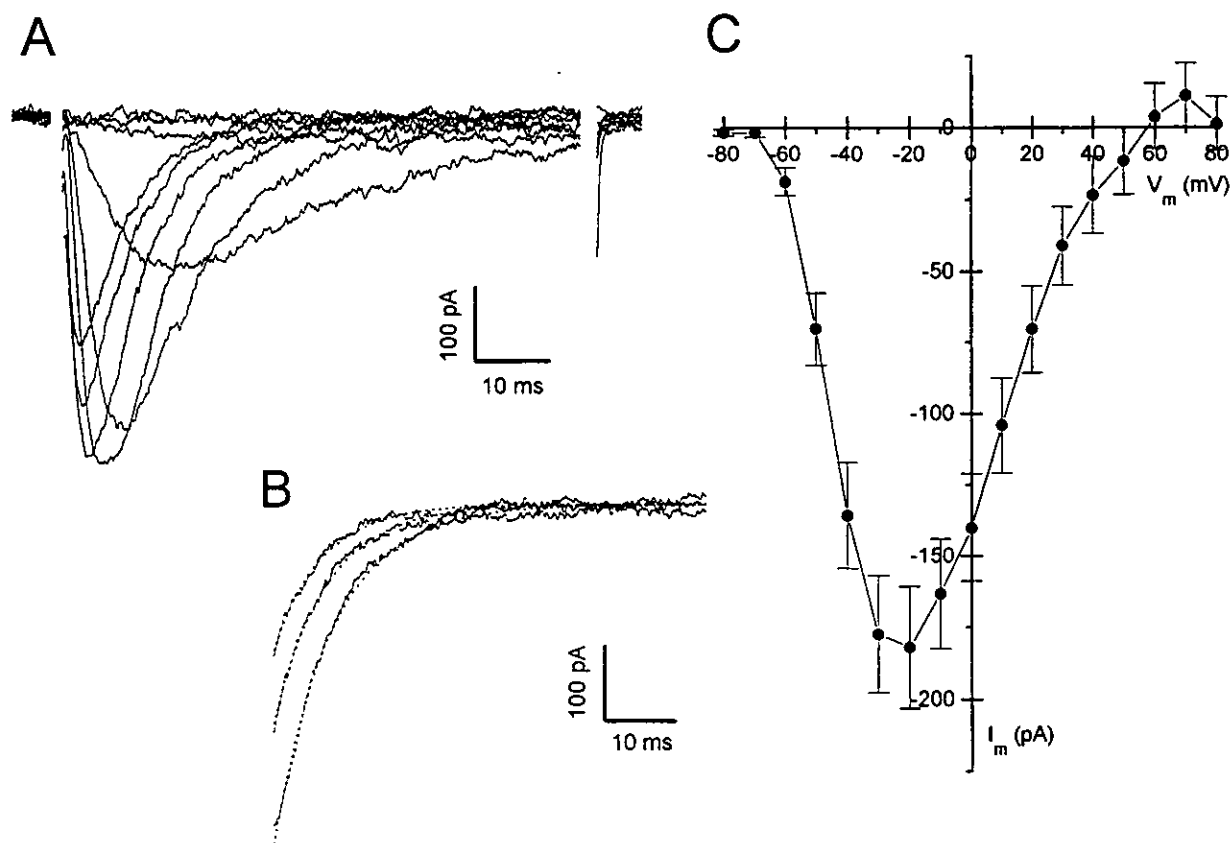


Fig. 2. Representative current-to-voltage (I - V) relationship of Ca^{2+} currents recorded in primary spermatocytes. *A*: family of currents evoked by stepping membrane potential to voltages between -70 and $+10$ mV, in 10 -mV increments, from a holding potential of -80 mV. Largest portion of noncompensated capacitive transients were blanked for clarity. *B*: dotted lines, single exponential fits to time courses of inactivation of currents elicited by steps to -20 , -10 , and 0 mV (continuous lines). Inactivation time constants are 8.2 , 7.4 , and 6.6 ms, respectively. *C*: mean I - V relationship obtained by averaging results from 23 individual cells and synplasts. Note absence of a high-threshold component of Ca^{2+} current. Error bars represent SE.

both t_p (*A*) and τ_h (*B*) decreased markedly with depolarization: t_p decreased 45% from 20.6 ± 1.6 ms at -40 mV (means \pm SE; $n = 16$) to 11.2 ± 1.2 ms at $+10$ mV ($n = 12$), whereas τ_h decreased 64% from 20.2 ± 3.1 ms ($n = 12$) to 7.2 ± 0.5 ms ($n = 8$) in the same voltage range. Both t_p and τ_h are voltage dependent, with τ_h showing the strongest voltage dependence (e -fold change per 7.47 mV vs. 18.3 mV for t_p). Also notice that t_p and τ_h decay monotonically with voltage toward a voltage-independent minimum of 10.7 and 7.3 ms, respectively. This suggests that voltage-independent transitions must exist in the pathway from the closed to the open state and from the activated to the inactivated states (9, 32). According to classical kinetic schemes of voltage-gated channels, the behavior of kinetic parameters for activation and inactivation provides an additional indication for the presence of a single class of Ca^{2+} channels being activated at the different membrane potentials (7).

Overall, these results indicate that the Ca^{2+} current present in mammalian spermatogenic cells belongs to the group of low-voltage-activated or T-type Ca^{2+} current found in a variety of excitable and nonexcitable cells (3, 21). Further information on the inactivation process of Ca^{2+} currents in spermatogenic cells was

obtained by examining the steady-state inactivation curve and the time course of recovery from inactivation.

Voltage dependence of activation and steady-state inactivation. Figure 4 illustrates an experiment in which activation and steady-state inactivation of the Ca^{2+} current were obtained for the same cell. Figure 4*A* shows a family of current records obtained with the pulse protocol (*top*). Peak Ca^{2+} conductances were calculated, and the activation curve (Fig. 4*C*, dotted line) was derived by fitting a Boltzmann relationship to the data (see MATERIALS AND METHODS). Activation occurs between -65 and -10 mV. A half-activation voltage ($V_{a/2}$) of -43.4 mV and a steepness parameter (k_a) of 7.09 mV were obtained for these data. In nine cells examined, $V_{a/2}$ and k_a averaged -47.3 ± 2.1 and 6.85 ± 0.26 (SE) mV, respectively.

Figure 4*B* shows current records used to construct the steady-state inactivation curve (see MATERIALS AND METHODS). In Fig. 4*C* (open circles), the normalized peak amplitude of the current elicited by the test pulse is plotted as a function of prepulse potential. Experimental data points were fitted with a Boltzmann relationship (continuous line). Inactivation occurs in the range from -90 to -40 mV. The potential of half-inactivation

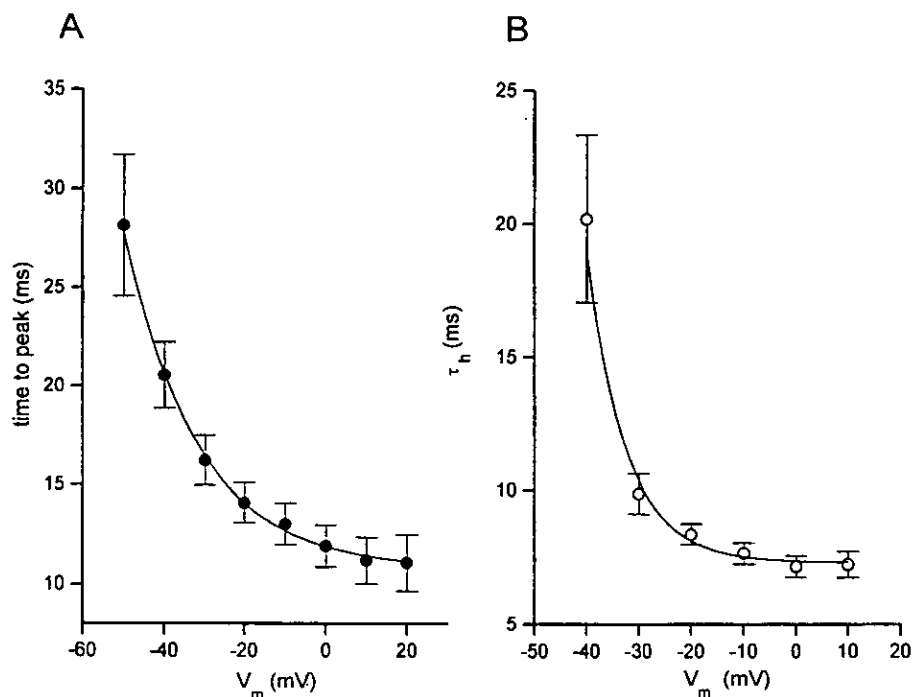


Fig. 3. Voltage dependence of kinetic parameters of activation and inactivation of Ca²⁺ currents. A: plot of mean values for time to peak (t_p) against command voltage ($n = 12$). Smooth line corresponds to exponential fit of data, with an e -fold change per 18.3 mV and voltage-independent offset of 10.7 ms. B: plot of mean values for time constant of inactivation (τ_h), obtained by fitting a single exponential to the decay phase of Ca²⁺ currents vs. step potential ($n = 8$). Smooth line indicates single exponential voltage dependence of τ_h with e -fold change per 7.47 mV and a voltage-independent offset of 7.3 ms. Error bars represent SE.

($V_{1/2}$) and the steepness parameter (k_i) were -63.6 and 4.46 mV, respectively. Values for these two parameters calculated in a total of 12 cells were: $V_{1/2} = -63.9 \pm 1.7$ (SE) mV and $k_i = 6.4 \pm 0.5$ (SE) mV.

The steady-state inactivation curve obtained is similar to that of the T-type Ca²⁺ current present in a variety of excitable (6, 19, 20, 24, 27, 44) and nonexcitable (25, 31–33) cells. A substantial degree of inactivation exists at potentials negative to the Ca²⁺ current activation range, suggesting that inactivation is predominantly under voltage control rather than induced

by Ca²⁺ influx during the conditioning prepulse. The small overlap of inactivation and activation curves in the voltage range between -60 and -50 mV (Fig. 4C) suggests that, whenever these cells stay within this range of membrane potentials for a period of time, a sustained Ca²⁺ current develops, allowing the continuous entry of Ca²⁺.

Deactivation kinetics. The relaxation of a Ca²⁺ current after removal of membrane depolarization provides information on the gating mechanism of the underlying voltage-gated ion channels. T-type channels

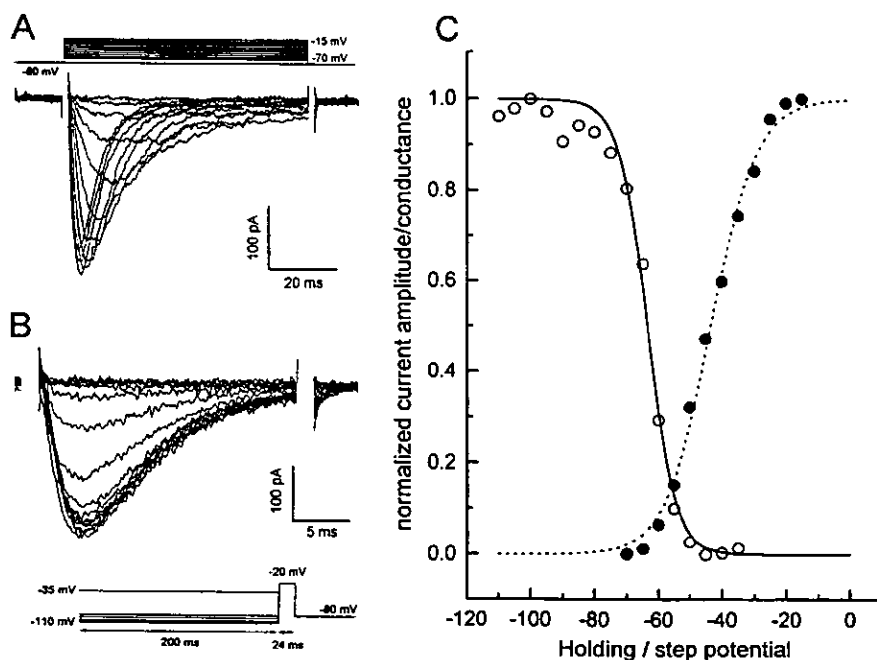


Fig. 4. Voltage-dependent activation and steady-state inactivation of Ca²⁺ current. A: family of current records obtained with activation pulse protocol shown on top. These records were used to construct the activation curve. B: current records obtained during test pulse to -20 mV of inactivation protocol shown on bottom. These records were used to construct the steady-state inactivation function. C: activation and inactivation curves. To obtain the activation curve, peak normalized Ca²⁺ conductances were calculated from current records shown in A and plotted against command voltage (\bullet). Dotted line was obtained by fitting a Boltzmann relationship to data (see MATERIALS AND METHODS). Half-inactivation value ($V_{1/2}$) was -43.4 mV and steepness parameter (k_a) was 7.09 mV. To obtain steady-state inactivation curve (continuous line), normalized peak amplitude of currents elicited by test pulse was plotted as a function of prepulse potential (\circ). These data points were fitted with a Boltzmann relationship (see MATERIALS AND METHODS). Half-inactivation ($V_{1/2}$) was -63.6 mV and steepness parameter (k_i) was 4.46 mV. Records shown in A and B were obtained from the same cell.

are distinguished by their relatively slow rate of closing (time constant >1 ms; see Refs. 9 and 30).

The voltage-dependent kinetics of Ca²⁺ channel closing in spermatogenic cells was measured as the rate of tail current decay at repolarizing potentials. Tail current deactivation could be fitted with single exponentials, whose time constant of decay (τ_d) decreased at more negative repolarization potentials (Fig. 5B). The fact that these tail currents were fitted to single exponential functions at all voltages further supports the notion that the activity of a single class of voltage-gated Ca²⁺ channels underlies the macroscopic Ca²⁺ currents of these cells. Tail current time constants showed a strong voltage dependence, increasing progressively at depolarized potentials. The τ_d showed little voltage dependence at potentials less than -85 mV. In the experiment shown in Fig. 5, A-C, the time constant of channel closing ranged from 5.8 ms at -45 mV to 0.9 ms at -100 mV. On average, the time constant of deactivation in six spermatogenic cells was 7.9 ± 1.3 (SE) ms at -50 mV and became shorter at more

negative membrane potentials, reaching 1.2 ± 0.1 (SE) ms at -100 mV, approaching an apparent voltage-independent minimum of ~1 ms at potentials negative to -95 mV (see Fig. 5D). This result suggests that, as demonstrated in other cell types, deactivation of T-type Ca²⁺ channels present in spermatogenic cells comprises a rapid voltage-independent transition observable only at very negative potentials (see Refs. 9 and 32).

Recovery from inactivation. The recovery from inactivation of Ca²⁺ currents was studied by using a double-pulse protocol. In Fig. 6, the amplitude of the peak current elicited by the test pulse, as a fraction of the response to the conditioning pulse from each run, is plotted against the length of the interval between pulses. At holding potentials of -110 and -100 mV, the time courses of recovery can be fitted by single exponential functions with similar time constants (τ_r) of 131.5 and 117.5 ms, respectively. At a holding potential of -80 mV, τ_r increased considerably to 376.5 ms, indicating that it is dependent on the potential applied during the interstimulus interval. A similar behavior was

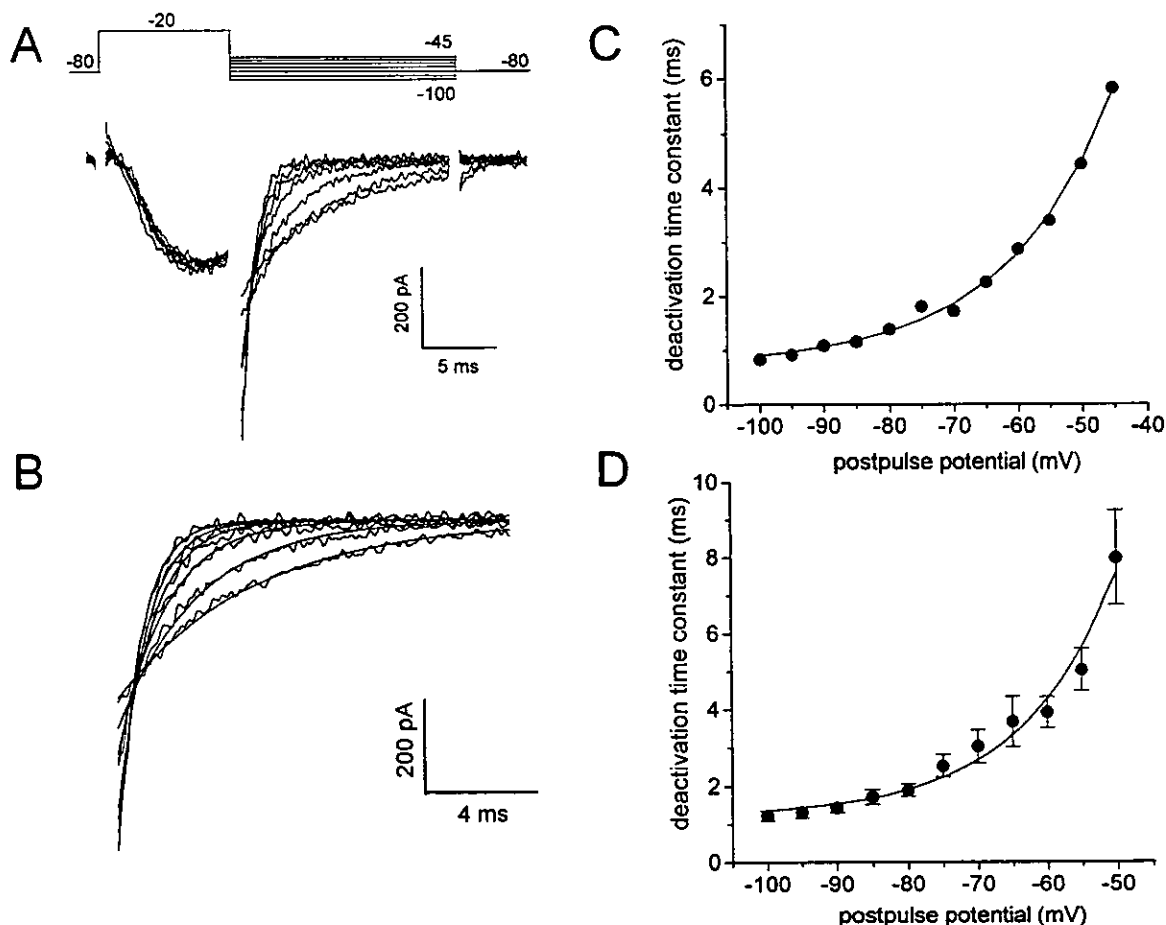


Fig. 5. Voltage dependence of deactivation kinetics. A: current records obtained with pulse protocol shown on top, designed to measure voltage-dependent kinetics of Ca²⁺ channel closing. Deactivation time constants (τ_d) were determined by fitting a single exponential to tail currents (B). C: plot of τ_d vs. repolarization voltage for family of tail currents shown in B. Smooth line indicates exponential voltage dependence of τ_d with an *e*-fold change per 16.9 mV. D: mean τ_d vs. repolarization potential for 6 spermatogenic cells. Smooth line indicates exponential voltage dependence of τ_d with an *e*-fold change per 13.6 mV. Error bars represent SE.

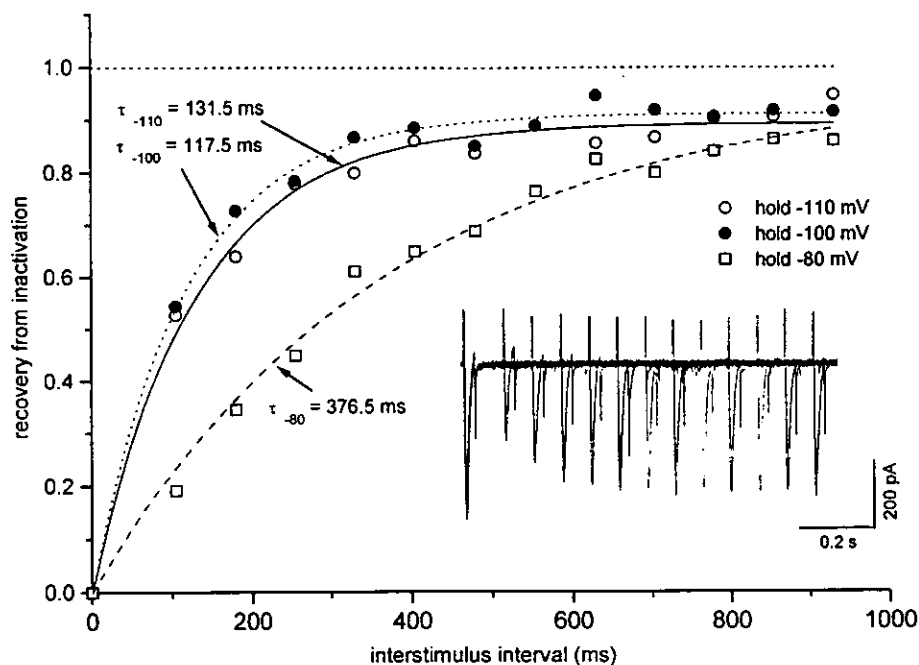


Fig. 6. Recovery from inactivation of Ca²⁺ currents. From a negative holding potential, 2 voltage pulses to -20 mV (conditioning and test pulses) were applied at different interstimulus intervals. *Inset*: superimposed traces from successive trials in an experiment where interstimulus interval was progressively increased (holding potential -80 mV). Amplitude of peak current elicited by test pulse, as a fraction of response to conditioning pulse from each trial, is plotted against interval between pulses. Time courses of recovery obtained at holding potentials of -110, -100, and -80 mV are shown. These time courses of recovery were fitted by single exponential functions with time constants (τ) of 131.5, 117.5, and 376.5 ms, respectively.

observed for the recovery of inactivation of T-type Ca²⁺ channels in other cell types (9). It is obvious from Fig. 6 that the recovery from inactivation at interstimulus intervals up to 900 ms in duration is not complete (85–90% recovery). This suggests that the recovery from inactivation of the Ca²⁺ current in mouse spermatogenic cells comprises a slower kinetic component, with a time constant of >1 s, similar to that reported for T-type Ca²⁺ currents in other cell types (19, 32). This slow component accounts for <20% of the recovery process. The time course of recovery measured for the T-type currents in spermatogenic cells is similar to that reported in 3T3 fibroblasts (9, 33) but significantly faster than in neurons (1, 7, 19).

Effects of Ca²⁺ channel blockers. Low-threshold T-type Ca²⁺ channels are potentially blocked by Ni²⁺ (15). Accordingly, we found that bath application of 100 and 200 μ M Ni²⁺ reduced the peak amplitude of the Ca²⁺ current in spermatogenic cells by $39.9 \pm 2.4\%$ ($n = 4$) and $75.6 \pm 3.9\%$ ($n = 2$), respectively. Ni²⁺ did not change significantly the voltage dependence of activation, voltage at which the maximal Ca²⁺ current is produced, nor its activation and inactivation kinetics (data not shown).

Amiloride, a K⁺-sparing diuretic, has been proposed as a good blocker of low-threshold Ca²⁺ currents (39). Figure 7 shows the effects of superfusing a spermatogenic cell with 500 μ M amiloride. Figure 7A shows the rapid (<10 s) inhibition of the peak Ca²⁺ current after amiloride application, as well as the slower and partial recovery after removal of the drug. Representative traces of the Ca²⁺ current elicited by step depolarizations to -20 mV obtained before, during, and immediately after the application of amiloride are shown in Fig. 7B (*traces a-c*). Amiloride inhibition of the peak Ca²⁺ current was $61.8 \pm 3.2\%$ ($n = 5$), and the

percentage of recovery after washout of the drug was $67 \pm 4.4\%$. Amiloride did not affect the voltage dependence of Ca²⁺ currents (data not shown) or its activation and inactivation kinetics. This is apparent in Fig. 7C, where *traces a* and *b* were normalized and superimposed for comparison.

It has been reported that dihydropyridines inhibit both depolarization and Ca²⁺ rises induced by a sulfated glycoprotein from the zona pellucida (ZP3), as well as the acrosome reaction in mammalian sperm (2, 14). These findings provide some support to the notion that L-type Ca²⁺ channels mediate voltage-gated Ca²⁺ fluxes in these cells. Nevertheless, as demonstrated in this study, L-type Ca²⁺ channels are conspicuously absent in mouse primary spermatocytes. Despite the fact that dihydropyridines are considered poor blockers of T-type Ca²⁺ channels in most cell types (3, 21), we decided to examine closely the effects of nifedipine on Ca²⁺ currents from spermatogenic cells. Figure 8A shows *I-V* relationships of Ca²⁺ currents obtained before and after bath application of 5 and 10 μ M nifedipine. It is clear from these *I-V* relationships that nifedipine inhibits these currents in a dose-dependent manner, without affecting their voltage dependence. The small shift (~10 mV) of the *I-V* curve to more negative voltages produced by nifedipine in this experiment was not observed in five other experiments. On average, 5 μ M nifedipine reduced peak Ca²⁺ current in spermatogenic cells by $38.44 \pm 8.5\%$ ($n = 5$), whereas 10 μ M nifedipine reduced Ca²⁺ current by $53.4 \pm 6.7\%$ ($n = 3$). Figure 8B illustrates the rapid and significant (~50%) inhibition of the peak Ca²⁺ current in a different spermatogenic cell after a brief puffer pipette application of 2 μ M nifedipine. In Fig. 8C, *traces a-c* taken from Fig. 8B were superimposed for comparison. Nifedipine did not affect the kinetics of activation or inactivation of Ca²⁺

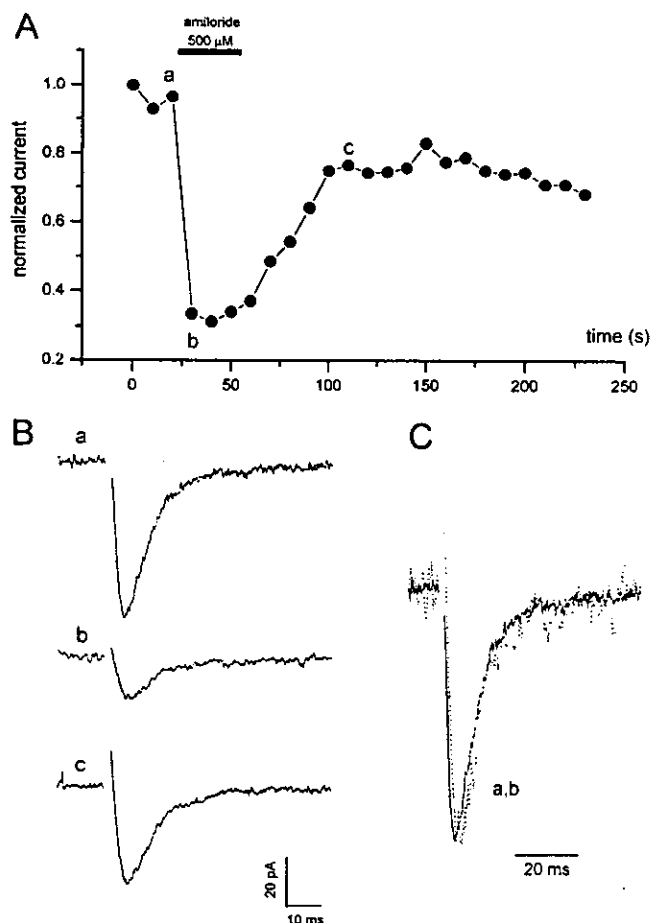


Fig. 7. Acute effects of amiloride on Ca²⁺ currents from spermatogenic cells. Amiloride (500 μ M dissolved in recording solution) was applied under pressure for 20 s via a puffer pipette located within 200 μ m from the recorded cell. *A*: plot of peak Ca²⁺ currents elicited by step depolarizations from -80 to -20 mV applied every 10 s. Notice rapid (<10 s) inhibition of peak Ca²⁺ current after amiloride application, as well as partial recovery after removal of drug. *B*: representative traces of Ca²⁺ currents elicited by test pulse at points indicated in graph. *C*: traces *a* and *b* were normalized to their peak amplitude and were superimposed for comparison of their activation and inactivation kinetics.

currents (see Fig. 8D), and their effects were partially reversible on washout of the drug. Data shown in Fig. 8 are representative of four experiments, where similar results were obtained. The dihydropyridine Ca²⁺ agonist BAY K 8644, tested at a concentration of 5 μ M ($n = 3$), did not significantly affect these Ca²⁺ currents (data not shown).

DISCUSSION

This paper describes a detailed study of the kinetic and pharmacological properties of Ca²⁺ channels expressed in developing male germ cells. On the basis of physiological and pharmacological evidence, we demonstrated that the only class of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in mouse spermatocytes is a member of the family of T-type Ca²⁺ currents (3, 21) with high sensitivity to blockade by dihydropyridines. To our knowledge, this is the first report of a cell type where

T-type Ca²⁺ channels are expressed in isolation. Accordingly, recent RT-PCR experiments indicate that only α_{1E} and to a minor extent α_{1A} Ca²⁺ channel genes are expressed in mouse spermatogenic cells (29). Because mature sperm lack the competence to synthesize new proteins, these channels are likely to be present in these cells as well, where they may play a crucial function in fertilization, by contributing to the Ca²⁺ influx required for the acrosome reaction.

Possible functional role of T-type Ca²⁺ currents in spermatogenic cells. The electrical properties of T-type Ca²⁺ currents (low threshold, rapid inactivation, and negative inactivation range) suggest that they may be involved in generating pacemaker activity and repetitive bursting in those excitable cells that express them (3). Their role is less obvious in nonexcitable cells. Nonetheless, their low threshold, incomplete inactivation with small depolarizations, and fast reactivation on repolarization make them suited for mediating episodes of Ca²⁺ influx, which could be important for regulating a variety of Ca²⁺-dependent cellular processes. For instance, it has been shown that the activity of T-type Ca²⁺ channels couple adrenocorticotrophic hormone-stimulated membrane depolarization to steroid hormone production in adrenal cells (12, 37). T-type Ca²⁺ currents expressed in steroidogenic Leydig cells (26) could play a similar role.

Differentiation and maturation. T-type Ca²⁺ currents are assumed to participate in the development of some cell types (3). The expression of T-type Ca²⁺ currents preceding neurite extension in mouse neuroblastoma cells (38) and in immature thalamic relay neurons after ablation of their cortical territory (10) could be related to this developmental function. T-type Ca²⁺ currents depolarize immature neurons, triggering spontaneous elevations of intracellular Ca²⁺ that encode different aspects of neuronal differentiation (16, 17). T-type Ca²⁺ channels also appear to be involved in differentiation and cell proliferation. Differentiation of bone marrow stromal cells by dexamethasone includes the expression of T-type Ca²⁺ currents (34). Also, the pharmacological inhibition of T-type Ca²⁺ channels in mouse fibroblasts suppresses both sustained Ca²⁺ influx and cell proliferation induced by platelet-derived growth factor (41).

Mouse primary spermatocytes remain in the pachytene stage for ~ 1 wk. After a brief diplotene/diakinesis stage, they undergo two meiotic divisions to produce secondary spermatocytes and then haploid spermatids. Pachytene spermatocytes transcriptionally represent the most active step in male germ cell development (8). We can imagine that T-type Ca²⁺ channels could mediate Ca²⁺ influx, which may constitute a signal for male germ cell development. This assumption receives support from two recent observations: 1) calmodulin, a unique Ca²⁺-binding protein, is specifically and abundantly expressed in pachytene spermatocytes (43); and 2) The density of Ca²⁺ current increases significantly near puberty, reaching maximum values after sexual maturation (unpublished observations). The feasibility of this hypothesis depends on the availability of a significant fraction of Ca²⁺ channels for activation,

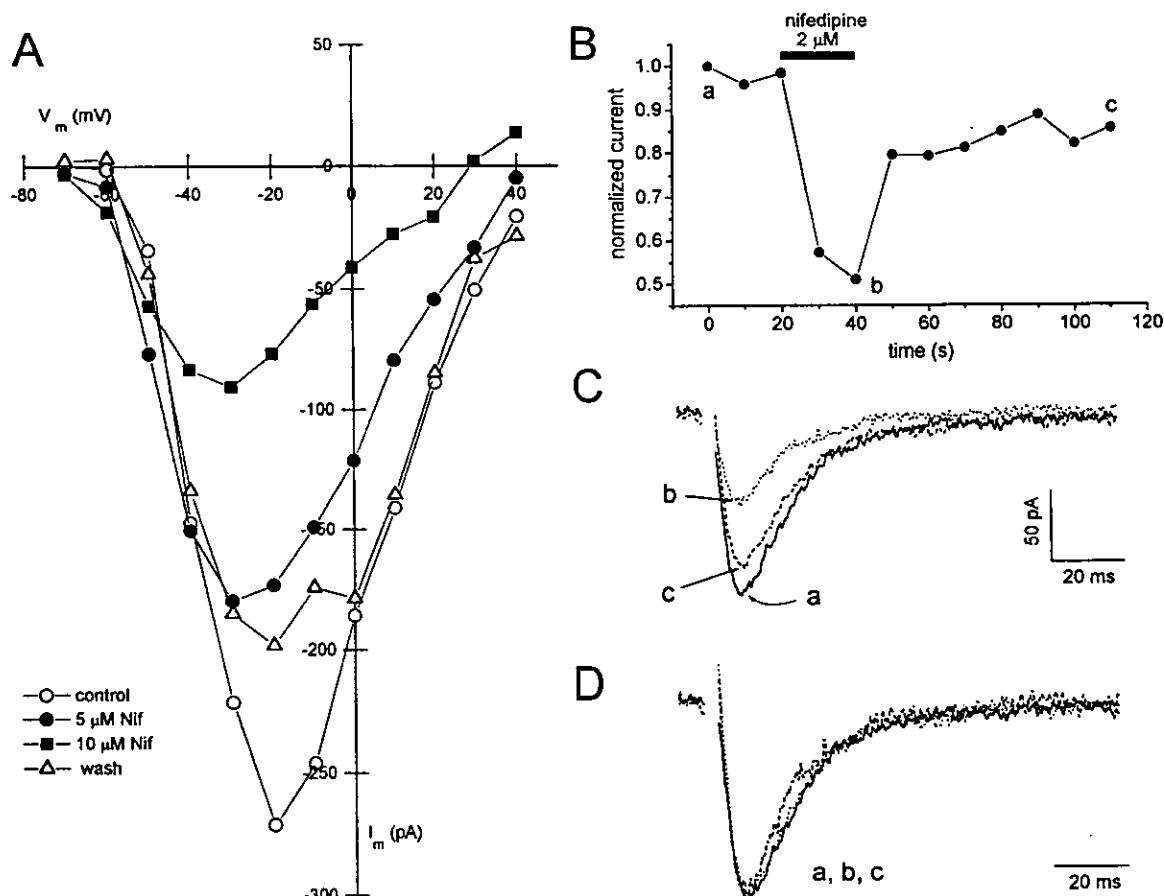


Fig. 8. Effects of nifedipine (Nif) on Ca²⁺ current of spermatogenic cells. *A*: Ca²⁺ current I - V relationships were obtained from same cell before and after bath application of 5 and 10 μ M nifedipine. In every case Ca²⁺ current records were obtained 1–2 min after nifedipine-containing solution had been introduced to the recording chamber. Recovery I - V relationship was obtained 5 min after nifedipine washout. *B*: Ca²⁺ currents were elicited by step depolarizations to -20 mV and monitored every 10 s in another spermatogenic cell. Nifedipine (2 μ M) was dissolved in recording external solution and applied under pressure onto the cell for 20 s at time indicated by solid horizontal bar. *C*: traces *a*-*c*, obtained at points illustrated in *B* were superimposed. They are represented, respectively, by continuous, dotted, and dashed lines. *D*: traces *a*-*c*, represented as in *C*, were normalized to their peak amplitude and superimposed for comparison of their activation and inactivation kinetics.

which would require that primary spermatocytes be capable of establishing a resting membrane potential more negative than approximately -40 mV (see Fig. 5). Nevertheless, resting potentials measured with current clamp mode in acutely dissociated rat spermatids are significantly lower (-27 mV; see Ref. 35); furthermore, the high K⁺ content of seminiferous tubule fluids (23) is expected to depolarize these cells even further. Under these conditions, T-type Ca²⁺ channels should be completely inactivated. Nonetheless, environmental signals could modulate the permeability properties of these cells, hyperpolarizing them (at least temporarily) to membrane potentials sufficiently negative to remove inactivation, allowing T-type Ca²⁺ currents to influence germ cell differentiation.

It has been suggested that a persisting inactivation of Ca²⁺ channels by voltage in spermatogenic cells could determine low levels of intracellular Ca²⁺, which then could be a signal for differentiation of metabolic dormancy (35). Interestingly, in an ongoing study of fura 2-loaded male germ cells, we found that pachytene

spermatocytes have the lowest (~ 50 nM) resting intracellular Ca²⁺ concentration among the population of spermatogenic cells obtained from the adult mouse. These Ca²⁺ levels remain unaltered over periods of observation up to 30 min, suggesting that Ca²⁺ channels lack spontaneous activity under our recording conditions. Notably, resting intracellular Ca²⁺ levels increase gradually at more advanced stages of spermatogenesis (unpublished observations).

Sperm physiology. It is well established that micromolar concentrations of dihydropyridines can block the acrosome reaction. Therefore, it has been postulated that L-type Ca²⁺ channels mediate depolarization-induced Ca²⁺ entry in mammalian sperm cells (2, 14). Nevertheless, as demonstrated in this study, L-type channels are seemingly absent in mouse spermatocytes, and the only type of Ca²⁺ channels present (T-type) exhibit high sensitivity to blockade by nifedipine. Recent findings indicate that a variety of dihydropyridine-sensitive T-type channels are expressed in

24. Hiriart, M., and D. R. Matteson. Na⁺ channels and two types of Ca²⁺ channels in rat pancreatic β cells identified by the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* 91: 617-639, 1988.
25. Jacob, T. J. C. Identification of a low-threshold T-type calcium channel in bovine ciliary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 261 (*Cell Physiol.* 30): C808-C813, 1991.
26. Kawa, K. Existence of calcium channels and intracellular couplings in the testosterone-secreting cells of the mouse. *J. Physiol. Lond.* 393: 647-666, 1987.
27. Keja, J. A., and K. S. Kits. Single-channel properties of high- and low-voltage-activated calcium channels in rat pituitary melanotropic cells. *J. Neurophysiol.* 71: 840-855, 1994.
28. Labarca, P., O. Zapata, C. Beltrán, and A. Darszon. Ion channels from the mouse sperm plasma membrane in planar bilayers. *Zygote* 3: 199-206, 1995.
29. Liévano, A., C. M. Santi, C. J. Serrano, C. L. Treviño, A. R. Bellvé, A. Hernández-Cruz, and A. Darszon. T-type Ca²⁺ channels and α_{1E} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388: 150-154, 1996.
30. Matteson, D. R., and C. M. Armstrong. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87: 161-182, 1986.
31. Mattioli, M., B. Barboni, and L. J. DeFelice. Calcium and potassium currents in porcine granulosa cells maintained in follicular or monolayer tissue culture. *J. Membr. Biol.* 134: 75-83, 1993.
32. Mlinar, B., B. A. Biagi, and J. J. Enyeart. Voltage-gated transient currents in bovine adrenal fasciculata cells. I. T-type Ca²⁺ current. *J. Gen. Physiol.* 102: 217-237, 1993.
33. Peres, A., E. Sturani, and R. Zippel. Properties of the voltage-dependent calcium channel of mouse Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Physiol. Lond.* 401: 639-655, 1988.
34. Publicover, S. J., G. P. Thomas, and A. J. El-Haj. Induction of a low voltage-activated, fast-inactivating Ca²⁺ channel in cultured bone marrow stromal cells by dexamethasone. *Calcif. Tissue Int.* 54: 125-132, 1994.
35. Reyes, J. G., J. Bacigalupo, R. Araya, and D. J. Benos. Ion dependence of resting membrane potential of rat spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 102: 313-319, 1994.
36. Romanin, C., K. Seydl, H. Glossmann, and H. Schindler. The dihydropyridine nifedipine inhibits T-type Ca²⁺ currents in atrial myocytes. *Pfluegers Arch.* 420: 410-412, 1992.
37. Rossier, M. F., C. P. Python, A. M. Capponi, W. Schlegel, C. Y. Kwan, and M. B. Vallotton. Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 132: 1035-1043, 1993.
38. Silver, R. A., and S. R. Bolsover. Expression of T-type calcium current precedes neurite extension in neuroblastoma cells. *J. Physiol. Lond.* 85: 79-83, 1991.
39. Tang, C.-M., F. Presser, and M. Morad. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science Wash. DC* 240: 213-215, 1988.
40. Tiwari-Woodruff, S. K., and T. C. Cox. Boar sperm plasma membrane Ca²⁺-selective channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 268 (*Cell Physiol.* 37): C1284-C1294, 1995.
41. Wang, Z., M. Estacion, and L. J. Mordan. Ca²⁺ influx via T-type channels modulates PDGF-induced replication of mouse fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.* 34): C1239-C1246, 1993.
42. Ward, C. R., and G. S. Kopf. Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* 158: 9-34, 1993.
43. Watanabe, D., K. Yamada, Y. Nishina, Y. Tajima, D. Koshimizu, A. Nagata, and Y. Nishimune. Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J. Biol. Chem.* 269: 7744-7749, 1994.
44. Young, R. C., L. H. Smith, and M. D. McLaren. T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 785-792, 1993.
45. Zeng, Y., E. N. Clark, and H. M. Florman. Sperm membrane potential. Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171: 554-563, 1995.

some cells (1, 12, 36). As shown in the present study, Ca²⁺ current expressed in mouse spermatogenic cells belongs to this variety of T-type Ca²⁺ channels. These findings are potentially important, because mature sperm lack the competence to synthesize new proteins (22), and the biogenesis of their ion channels must occur during spermiogenesis or perhaps even throughout spermatogenesis. If the assortment of ion channels expressed during late spermatogenesis persist unaltered in mature sperm, our results could indicate that the activity of T-type rather than L-type Ca²⁺ channels may be important for initiating the acrosome reaction. It is worth noting that, after capacitation, a process required by mammalian sperm to acquire fertilizing capacity, the cell hyperpolarizes from about -30 to -60 mV, probably because of an increase in K⁺ permeability (45). It is conceivable that this initial hyperpolarization, by removing inactivation from T-type Ca²⁺ channels, would allow them to open in response to ZP3, leading to acrosomal exocytosis.

A voltage-gated Ca²⁺-permeable channel present in mouse sperm has been recorded in lipid bilayers (5, 28), but its properties (high conductance, low selectivity, several subconductance states) are very different from those of typical Ca²⁺ channels (3). Another Ca²⁺-selective channel from boar sperm has also been recorded in lipid bilayers. This channel is activated by the dihydropyridine agonist (\pm) BAY K 8644 and blocked by the antagonist nitrendipine. However, in contrast to other dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels, the sperm channel has little voltage dependence and lacks time-dependent inactivation or rundown (40). It is conceivable that the sperm membranes possess permeation pathways for regulated Ca²⁺ influx other than the usual voltage-gated Ca²⁺ channels or that voltage dependence was lost during isolation.

Further characterization of voltage-gated Ca²⁺ channels present in spermatogenic cells at earlier stages of maturation, as well as at postmeiotic stages, is required to understand the function of these Ca²⁺ channels. Also, these unique cells may constitute a valuable resource to investigate the properties of alternative Ca²⁺-permeation pathways that may also be present in the sperm membrane.

We thank Drs. José Bargas, Ariel Escobar, Bernardo Rudy, and Pedro Labarca for reviewing an earlier version of this manuscript and for many useful comments.

This work was supported by grants to A. Hernández-Cruz and A. Darszon from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN200992, IN207893, and IN206894) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (F052 and 3429-N9303) (Mexico).

A. Darszon is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. This work was conducted by C. M. Santi in partial fulfillment of her PhD thesis.

Address for reprint requests: A. Hernández-Cruz, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, PO Box 70-253, Mexico City, DF 04510, Mexico.

Received 19 March 1996; accepted in final form 3 May 1996.

REFERENCES

1. Akaike, N., P. G. Kostyuk, and Y. V. Osipchuk. Dihydropyridine-sensitive low-threshold Ca²⁺ channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. Lond.* 412: 181-195, 1989.
2. Babcock, D. F., and D. R. Pfeiffer. Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺]_i and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262: 15041-15047, 1987.
3. Bean, B. P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 367-384, 1989.
4. Bellvé, A. R., C. F. Millette, Y. M. Bhatnagar, and D. A. O'Brien. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 480-494, 1977.
5. Beltrán, C., A. Darszon, P. Labarca, and A. Liévano. A high conductance voltage-dependent multistate Ca²⁺ channel found in sea urchin and mouse sperm. *FEBS Lett.* 338: 23-26, 1994.
6. Biagi, B. A., and J. J. Enyeart. Multiple calcium currents in a thyroid C-cell line: biophysical properties and pharmacology. *Am. J. Physiol.* 260 (Cell Physiol. 29): C1253-C1263, 1991.
7. Carbone, E., and H. D. Lux. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol. Lond.* 386: 547-570, 1987.
8. Cebra-Thomas, J. A., and L. M. Silver. Genetic aspects of sperm differentiation and function in the mouse. In: *Elements of Mammalian Fertilization. Basic Concepts*, edited by P. M. Wassarman. Boca Raton, FL: CRC, 1991, vol. 1, p. 29-66.
9. Chen, C., and P. Hess. Mechanism of gating of T-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 96: 603-630, 1990.
10. Chung, J. M., J. R. Huguenard, and D. A. Prince. Transient enhancement of low-threshold calcium current in thalamic relay neurons after corticectomy. *J. Neurophysiol.* 70: 20-27, 1993.
11. Darszon, A., P. Labarca, C. Beltrán, J. García-Soto, and A. Liévano. Sea urchin sperm. An ion channel reconstitution study case. *Methods: Companion to Methods Enzymol.* 6: 37-50, 1994.
12. Enyeart, J. J., B. Mlinar, and J. A. Enyeart. T-type Ca²⁺ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *Mol. Endocrinol.* 7: 1031-1040, 1993.
13. Florman, H. M., and D. F. Babcock. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. In: *Elements of Mammalian Fertilization. Basic Concepts*, edited by P. M. Wassarman. Boca Raton, FL: CRC, 1991, vol. 1, p. 105-132.
14. Florman, H. M., M. Corron, T. Kim, and D. F. Babcock. Activation of voltage-dependent calcium channels in mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 152: 304-314, 1992.
15. Fox, A. P., M. C. Nowycky, and R. W. Tsien. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol. Lond.* 394: 149-172, 1987.
16. Gu, X., and N. C. Spitzer. Low threshold Ca²⁺ current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca²⁺ in developing *Xenopus* neurons. *J. Neurosci.* 13: 4936-4948, 1993.
17. Gu, X., and N. C. Spitzer. Different aspects of differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature Lond.* 375: 784-787, 1995.
18. Hagiwara, S., and K. Kawa. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J. Physiol. Lond.* 356: 135-149, 1984.
19. Hernández-Cruz, A., and H.-C. Pape. Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. *J. Neurophysiol.* 61: 1270-1283, 1989.
20. Herrington, J., and C. J. Lingle. Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca²⁺ current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 68: 213-232, 1992.
21. Hess, P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 337-356, 1990.
22. Hetch, N. B. Post meiotic gene expression during spermatogenesis. In: *Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis*, edited by F. P. Haseltine and N. L. First. New York: Liss, 1988, vol. 267, p. 291.
23. Hinton, B. T., and T. T. Turner. The seminiferous tubular environment. In: *Cell and Molecular Biology of the Testis*, edited by C. Desjardins and L. L. Ewing. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1993, p. 238-265.

24. Hiriart, M., and D. R. Matteson. Na⁺ channels and two types of Ca²⁺ channels in rat pancreatic β cells identified by the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* 91: 617–639, 1988.
25. Jacob, T. J. C. Identification of a low-threshold T-type calcium channel in bovine ciliary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 261 (*Cell Physiol.* 30): C808–C813, 1991.
26. Kawa, K. Existence of calcium channels and intracellular couplings in the testosterone-secreting cells of the mouse. *J. Physiol. Lond.* 393: 647–666, 1987.
27. Keja, J. A., and K. S. Kits. Single-channel properties of high- and low-voltage-activated calcium channels in rat pituitary melanotrophic cells. *J. Neurophysiol.* 71: 840–855, 1994.
28. Labarca, P., O. Zapata, C. Beltrán, and A. Darszon. Ion channels from the mouse sperm plasma membrane in planar bilayers. *Zygote* 3: 199–206, 1995.
29. Liévano, A., C. M. Santi, C. J. Serrano, C. L. Treviño, A. R. Bellvé, A. Hernández-Cruz, and A. Darszon. T-type Ca²⁺ channels and α_{1E} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388: 150–154, 1996.
30. Matteson, D. R., and C. M. Armstrong. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87: 161–182, 1986.
31. Mattioli, M., B. Barboni, and L. J. DeFelice. Calcium and potassium currents in porcine granulosa cells maintained in follicular or monolayer tissue culture. *J. Membr. Biol.* 134: 75–83, 1993.
32. Mlinar, B., B. A. Biagi, and J. J. Enyeart. Voltage-gated transient currents in bovine adrenal fasciculata cells. I. T-type Ca²⁺ current. *J. Gen. Physiol.* 102: 217–237, 1993.
33. Peres, A., E. Sturani, and R. Zippel. Properties of the voltage-dependent calcium channel of mouse Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Physiol. Lond.* 401: 639–655, 1988.
34. Publicover, S. J., G. P. Thomas, and A. J. El-Haj. Induction of a low voltage-activated, fast-inactivating Ca²⁺ channel in cultured bone marrow stromal cells by dexamethasone. *Calcif. Tissue Int.* 54: 125–132, 1994.
35. Reyes, J. G., J. Bacigalupo, R. Araya, and D. J. Benos. Ion dependence of resting membrane potential of rat spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 102: 313–319, 1994.
36. Romanin, C., K. Seydl, H. Glossmann, and H. Schindler. The dihydropyridine nifedipine inhibits T-type Ca²⁺ currents in atrial myocytes. *Pfluegers Arch.* 420: 410–412, 1992.
37. Rossier, M. F., C. P. Python, A. M. Capponi, W. Schlegel, C. Y. Kwan, and M. B. Vallotton. Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 132: 1035–1043, 1993.
38. Silver, R. A., and S. R. Bolsover. Expression of T-type calcium current precedes neurite extension in neuroblastoma cells. *J. Physiol. Lond.* 85: 79–83, 1991.
39. Tang, C.-M., F. Presser, and M. Morad. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science Wash. DC* 240: 213–215, 1988.
40. Tiwari-Woodruff, S. K., and T. C. Cox. Boar sperm plasma membrane Ca²⁺-selective channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 268 (*Cell Physiol.* 37): C1284–C1294, 1995.
41. Wang, Z., M. Estacion, and L. J. Mordan. Ca²⁺ influx via T-type channels modulates PDGF-induced replication of mouse fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.* 34): C1239–C1246, 1993.
42. Ward, C. R., and G. S. Kopf. Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* 158: 9–34, 1993.
43. Watanabe, D., K. Yamada, Y. Nishina, Y. Tajima, D. Koshimizu, A. Nagata, and Y. Nishimune. Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J. Biol. Chem.* 269: 7744–7749, 1994.
44. Young, R. C., L. H. Smith, and M. D. McLaren. T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 785–792, 1993.
45. Zeng, Y., E. N. Clark, and H. M. Florman. Sperm membrane potential. Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171: 554–563, 1995.

T-type Ca^{2+} channels and α_{1E} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction

Arturo Liévano^{a,**}, Celia M. Santi^{a,b}, Carmen. J. Serrano^a, Claudia L. Treviño^a, Anthony R. Bellvé^c, Arturo Hernández-Cruz^b, Alberto Darszon^{a,*}

^aDepto. Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología-UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^bDepto. Biofísica, Instituto de Fisiología Celular-UNAM, Mexico City, Mexico

^cDept. of Anatomy, Cell Biology and Urology, and Center for Reproductive Sciences, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA

Received 12 April 1996

Abstract There is pharmacological evidence that Ca^{2+} channels play an essential role in triggering the mammalian sperm acrosome reaction, an exocytotic process required for sperm to fertilize the egg. Spermatozoa are small terminally differentiated cells that are difficult to study by conventional electrophysiological techniques. To identify the members of the voltage-dependent Ca^{2+} channel family possibly present in sperm, we have looked for the expression of the α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} and α_{1E} genes in mouse testis and in purified spermatogenic cell populations with RT-PCR. Our results indicate that all 5 genes are expressed in mouse testis, and in contrast only α_{1E} , and to a minor extent α_{1A} , are expressed in spermatogenic cells. In agreement with these findings, only T-type Ca^{2+} channels sensitive to the dihydropyridine nifedipine were observed in patch-clamp recordings of pachytene spermatocytes. These results suggest that low-threshold Ca^{2+} channels are the dihydropyridine-sensitive channels involved in the sperm acrosome reaction.

Key words: T-type Ca^{2+} channel; Sperm acrosome reaction; α_{1E} subunit; Dihydropyridine; Spermatogenesis; RT-PCR

1. Introduction

Ca^{2+} channels play a key role in cell signalling [1,2]. Mammalian spermatozoa must undergo Ca^{2+} -dependent exocytosis of the acrosomal granule to fertilize the egg [3]. ZP3, a sulfated glycoprotein from the zona pellucida, a thick extracellular glycoprotein coat surrounding the egg, is the main mediator of sperm binding and the acrosome reaction (AR) in mammals [3]. ZP3 activates a transduction mechanism dependent on extracellular Ca^{2+} that increases intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and pH (pH_i), and leads to acrosomal exocytosis. These changes are inhibited by pertussis toxin (PTX) indicating their regulation by G_i proteins [4,5].

Pharmacological evidence indicates that voltage-dependent Ca^{2+} channels are fundamental in this exocytotic process. High affinity binding sites for the L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel antagonist PN200-110, were detected in bull and ram sperm membranes [5]. Several inorganic divalent cations like Co^{2+} and Ni^{2+} , and dihydropyridine antagonists, equally block acrosomal exocytosis triggered by a combined elevation of pH_i and a K^+ induced depolarization (mouse,

bull and ram spermatozoa) or by ZP3 in bull sperm [5]. Depolarizing conditions that appear to open Ca^{2+} channels, bypass the inhibition of the ZP3-induced exocytosis produced by PTX. These experiments indicate that opening of sperm voltage-dependent Ca^{2+} channels is enough to trigger the AR when pH_i is increased, and that the activation of these channels, which involves a PTX sensitive G protein, is a required step in the ZP3 signal transduction pathway [5].

The direct study of sperm Ca^{2+} channels has been difficult due to their small size and complex geometry [6]. In addition, spermatozoa are terminally differentiated cells lacking the machinery for protein synthesis. Therefore, all ion channels required for cell function must be synthesized during spermatogenesis. As an approach to study Ca^{2+} channels in mouse sperm we looked for transcripts of the genes coding for the subunit that contains the pore and the voltage sensor of several voltage-dependent Ca^{2+} channels (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} and α_{1E}) in both testis and in purified spermatogenic cell populations. We found that spermatogenic cells have mainly transcripts of the α_{1E} gene. We also obtained whole-cell patch-clamp recordings in pachytene spermatocytes. These cells only functionally express T-type Ca^{2+} channels sensitive to nifedipine and Ni^{2+} in their plasma membrane. Since the sperm AR and the uptake of Ca^{2+} that triggers it are also inhibited by these blockers, it is likely that a T-type Ca^{2+} channel is involved in inducing this reaction.

2. Materials and methods

2.1. Spermatogenic cell dissociation and purification for RT-PCR

Testes from adult CD-1 mice were used as a source of germ cells. They were decapsulated, and the seminiferous tubules suspended in EKRB (in mM: 120.1 NaCl, 4.8 KCl, 25.2 NaHCO_3 , 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 1.3 CaCl_2 , 11 glucose, 1 glutamine, 1 \times essential amino acids (Sigma), 1 \times non-essential amino acids (Sigma)), adjusted to pH 7.2 with CO_2 . Spermatogenic cells were obtained as described [7], resuspended into EKRB 0.5% BSA and filtered through an 80 μm mesh Nytex nylon filter (Tetko Inc., Lancaster NY). The single-cell suspension of germ cells was sedimented at unit gravity through a 2–4% BSA linear gradient generated on a staput chamber (Johns Scientific, Ontario) at 4°C. Gradients were collected after 2.5 h in 10-ml fractions, which were assessed for cell morphology and purity by light microscopy using Nomarski optics, and similar fractions were pooled.

2.2. RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNAs from seminiferous tubules and spermatogenic cells were extracted as described [8]. Prior to each reverse transcription (RT) reaction, 5 μg of total RNA were dissolved in 10 μl water and digested with 1 U RNase-free DNase (RQ1, Promega Co., Madison) in the transcription buffer (in mM: 50 KCl, 2.5 MgCl_2 , 20 Tris-HCl, pH 8.4) for 10 min at 37°C, and the DNase was heat inactivated at

*Corresponding author. Fax: (52) (73) 17 23 88.
E-mail: darszon@ibt.unam.mx

**The first two authors made an equal contribution.

65°C for 15 min. At this point, random hexamers were added to a final concentration of 2.5 ng/ μ l, and quickly chilled on ice. RT was achieved with the Superscript preamplification system (Gibco BRL, Gaithersburg MD), according to the manufacturer's instructions. Similar results were obtained by priming the cDNA synthesis with oligo-dT₁₂₋₁₈. For the polymerase chain reaction we designed oligonucleotides against α_{1A} (5'-CGGGATCCCCGAAGCAGTCGATGGC-GCAGAGA and 5'-GGAATTCCTTGTGGGCCCTTCCCAG-TAC), α_{1B} (5'-CGGGATCCCCGACCGAATGGCCGCCCTTCGAA and 5'-GGAATTCCTGAGGATGGCGAAGAAGAGCA), α_{1C} (5'-CGGGATCCCCGCAATGCAGCTGCAGGACTTGC and 5'-GGA-ATTCCTTATGCCCTCCTGGTTGTAGC), α_{1D} (5'-CGGGATCC-CGGCCATGCAGCACTATGAGCAA and GGAATTCCTTCAT-GATGACAGCCACGAAGA), and α_{1E} (5'-GGATCCAGCAGGA-ACCGACAAGGAACC and 5'-GAATTCGGTGGCCAGGAT-CATGTACTC) Ca²⁺ channel subunits. Amplifications were performed on a PTC-100 programmable thermal controller (M.J. Res. Inc., Watertown MA) with Taq DNA polymerase (Boehringer, Mannheim, Germany). PCR reactions were carried out in a final volume of 50 μ l having 200 μ M dNTP, 250 μ M each primer, 1.5 mM MgCl₂. Mixtures were overlaid with mineral oil, and PCR was initiated by adding 2.5 units of Taq DNA polymerase at 85°C ('hot start') per reaction. Cycling was 94°C for 3 min during the first cycle, annealing at 56°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and denaturation for 45 s during 35 cycles. Amplimer identity was checked by direct double-strand sequencing of the gel purified fragment with the dsDNA Cycle Sequencing System (Gibco BRL), according to the supplier's instructions.

2.3. Whole-cell patch-clamp experiments

Spermatogenic cells were obtained as described [7], except that Ca²⁺-free solutions were used. The dissociated cells were stored at 4–10°C and remained healthy for at least 12 h. An aliquot of the cell suspension was placed in a recording chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp.), and was continuously superfused with recording medium (in mM: 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 Na-HEPES, 5 glucose, 10 CaCl₂, pH 7.35) at 20–23°C. Most cells included in this study were at the pachytene stage of differentiation, although similar recordings were obtained from round spermatids as well. Pachytene spermatocytes are easily recognizable under phase contrast microscopy because of their large diameter (> 16 μ m), and distinct condensed chromatin (see Fig. 3C,D). Ca²⁺ currents were recorded with an Axopatch 1-D amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) connected to the pip-

ette and the bath by Ag-AgCl wires. The pipette internal solution was (in mM: 110 Cs-methanesulfonate, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-BAPTA, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 5 Cs-HEPES, pH 7.35). Glass borosilicate pipettes were pulled to tip diameters of about 1.5 μ m, having resistances ranging between 2 and 5 M Ω when filled with pipette solution. Records were low-pass filtered at 2 kHz (4-pole Bessel filter), digitized at 30 kHz and analyzed off-line. A p/4 pulse protocol was used routinely to minimize leak and capacitive currents from current records [9], and series resistance was compensated by at least 50%. Nifedipine-containing extracellular solutions were prepared fresh from concentrated stock solutions. They were pressure-applied (10 lb/inch²) via a puffer pipette located within 200 μ m from the cell under examination, which was controlled by a Picospritzer II device (General Valve, Fairfield, NJ). Application of normal external solution with or without vehicle did not induce significant changes in Ca²⁺ currents. IC₅₀s were estimated according to: IC₅₀ = ([B](1-F_B))/F_B, where [B] corresponds to the blocker concentration, and F_B is the fraction of the peak current blocked at a -20 mV test potential in the presence of the blocker [10].

3. Results and discussion

Spermatozoa are small terminally differentiated cells with a complicated geometry. This has limited the characterization of their ion channels [11,12]. Only three patch-clamp studies have been reported on sperm, two in the sea urchin [13,14], and one in mammals describing a cGMP-regulated cation channel [15]. Incorporation of isolated sperm plasma membranes to planar bilayers has revealed the presence of Ca²⁺ channels, among other types, in sea urchin and mammalian spermatozoa [16–21].

Since mature sperm lack the protein synthesis machinery and most RNAs, the only way to study gene expression and protein assembly is in the progenitor spermatogenic cells. We used mouse testis as starting material to look for Ca²⁺ channel gene transcripts. Voltage-dependent Ca²⁺ channels are heteromultimeric membrane proteins coded by a superfamily of related genes. The α_1 subunit, which contains both the pore and the voltage-sensor, is the main subunit [22]. Six α_1 sub-

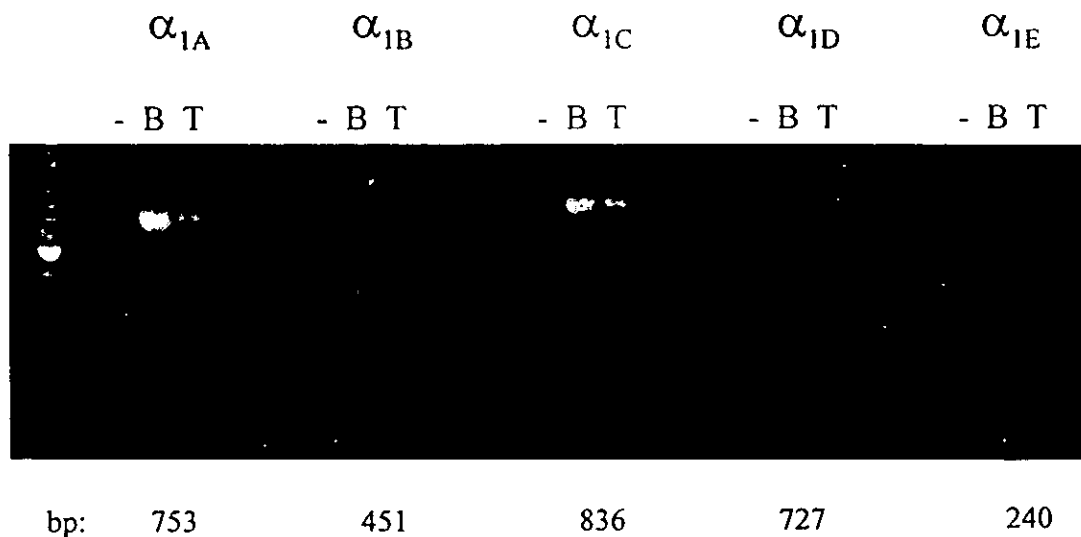


Fig. 1. RT-PCR experiments showing the expression of α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} and α_{1E} Ca²⁺ channel subunit genes in mouse brain (B) and testis (T) RNA. Total mouse brain and testis RNAs were DNase I-treated before reverse-transcribed. The first-strand cDNAs were amplified with specific primers against α_1 subunits for 35 cycles. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The identity of the amplicons was confirmed by double-strand sequencing. The minus sign indicates reactions without cDNA, as controls. Numbers on the bottom indicate amplicon sizes in bp. The DNA molecular weight marker was a 100-bp DNA ladder having a more intense 600 bp band.

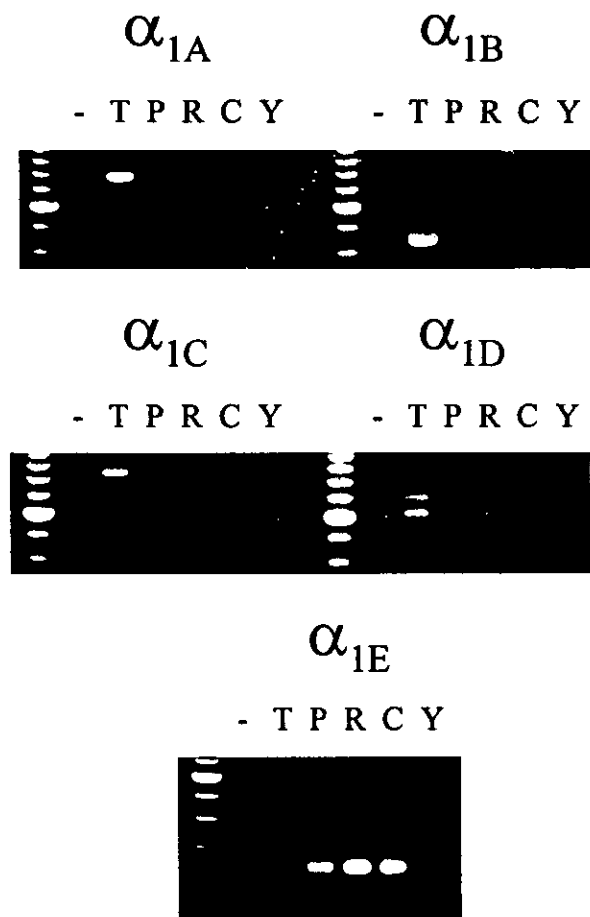


Fig. 2. RT-PCR experiments showing the expression of Ca^{2+} channel α_1 subunits in pachytene spermatocyte (P), round (R) and condensing (C) spermatid and residual body (Y) RNA. Testis (T) was included for comparison. Experimental conditions were as in Fig. 1.

unit genes have been described in mammals, now termed α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} and α_{1S} [23].

As a first approach to the molecular identification of the Ca^{2+} channel genes expressed in sperm, we performed RT-PCR experiments with specific oligonucleotides against α_{1A} – α_{1E} in mouse testis cDNA. Fig. 1 shows the electrophoretic pattern of the amplimers obtained in mouse brain (lanes labeled B) and testis (lanes labeled T). The expected sizes (in bp) were: 753 for α_{1A} , 451 for α_{1B} , 836 for α_{1C} , 727 for α_{1D} and 240 for α_{1E} . We obtained RT-PCR amplimers with the expected sizes for all tested oligo pairs, and the amplimer identity was confirmed by double-strand sequencing (Torres and Liévano, unpublished results). Only with α_{1D} did we obtain a double band, probably indicating the existence of alternatively spliced products in the testis. These experiments show that all five α_1 subunit genes are expressed in the mouse testis, which is not surprising, since testis contains intertubular tissue (blood and lymphatic vessels, nerve fibers, and Leydig, Sertoli, myoid cells), and the different types of spermatogenic cells [24]. Multiple α_1 gene expression has also been reported in excitable cell lines [25].

In purified spermatogenic cells, however, α_1 subunit gene expression is different, as shown in Fig. 2. RT-PCR experiments in pachytene spermatocytes (P), round (R) and conden-

sing (C) spermatids, and residual bodies (Y) showed detectable expression of the α_{1E} gene, giving the expected 240 bp amplimer in all cDNAs. Although less intense, there were also PCR positives for α_{1A} in round and condensing spermatids, and in the residual bodies. This is probably a minor transcript since the same amount of cDNA was used in all samples. Fig. 2 shows that the α_{1B} , α_{1C} and α_{1D} transcripts are absent in spermatogenic cells. Thus, these cells basically only have α_{1E} transcripts that could be physiologically relevant.

The participation of L-type Ca^{2+} channels during the sperm AR in mammals and in sea urchins has been invoked because of the inhibitory effect of dihydropyridines and diphenylalkylamines on this reaction and on the Ca^{2+} uptake that occurs along with it [5,26,27]. However, it is known that μM concentrations of dihydropyridines are able to block low-threshold T-type currents in some preparations [25,28,29]. The fact that high dihydropyridine concentrations (μM) are required to inhibit the AR makes it difficult to distinguish whether an L- or a T-type Ca^{2+} channel is involved in this process. In an attempt to answer this question we carried out whole-cell patch-clamp recordings in pachytene spermatocytes. Typical whole-cell Ca^{2+} currents recorded from these cells are shown in Fig. 3A. They were evoked from a holding potential of -80 mV to test pulses in the range of -70 to $+40$ mV. These Ca^{2+} currents were transient and had fast kinetics, they activated at low depolarizations, and displayed activation and inactivation kinetics typical of T-type channels. The I - V curve obtained from the records in Fig. 3A is shown in Fig. 3B. Analogous inactivating, low-threshold Ca^{2+} channel currents were described in rat spermatogenic cells [30]. Our whole-cell records do not show evidence for the presence of high-voltage activated, non-inactivating Ca^{2+} channels, such as L-type channels. A typical pachytene spermatocyte is shown in Fig. 3C,D. We assessed the effects of dihydropyridines on the pachytene spermatocyte Ca^{2+} currents. Fig. 3E shows superimposed traces elicited by depolarization to -20 mV, obtained before, during and after the application of 2 μM nifedipine. It is evident from the records that nifedipine is able to reversibly block the T-type Ca^{2+} channels with an estimated $\text{IC}_{50} = 8.1$ μM ($n = 5$). The channels blocked by nifedipine correspond to T-type Ca^{2+} channels, as shown by the superposition of the normalized Ca^{2+} currents in the presence and absence of the blocker (Fig. 3E). It is known that T-type channels are blocked by external Ni^{2+} [31]. Spermatocyte T-type channels are also sensitive to Ni^{2+} , with an estimated $\text{IC}_{50} = 150$ μM ($n = 4$). A preliminary account of these currents has been presented [32], and a complete electrophysiological characterization submitted [33].

T-type channel molecular identification still remains elusive. The only cloned member of the low-threshold Ca^{2+} channels is the rat brain α_{1E} subunit [34]. This channel shows transient kinetics when expressed in *Xenopus* oocytes, and is sensitive to external Ni^{2+} ($\text{IC}_{50} = 28$ μM). As the low-threshold Ca^{2+} channels, α_{1E} is able to transport Ca^{2+} only slightly more efficiently than Ba^{2+} [35]. This is also the case for the spermatogenic cell expressed Ca^{2+} channels, both in rat [30] and in the mouse [33].

Heterologous expression of several structurally related members of the α_{1E} has shown a large variation in the voltage-dependence of channel activation [35–38]. The biophysical properties of heterologously expressed α_1 subunits depend on the auxiliary subunits coexpressed, particularly the β sub-

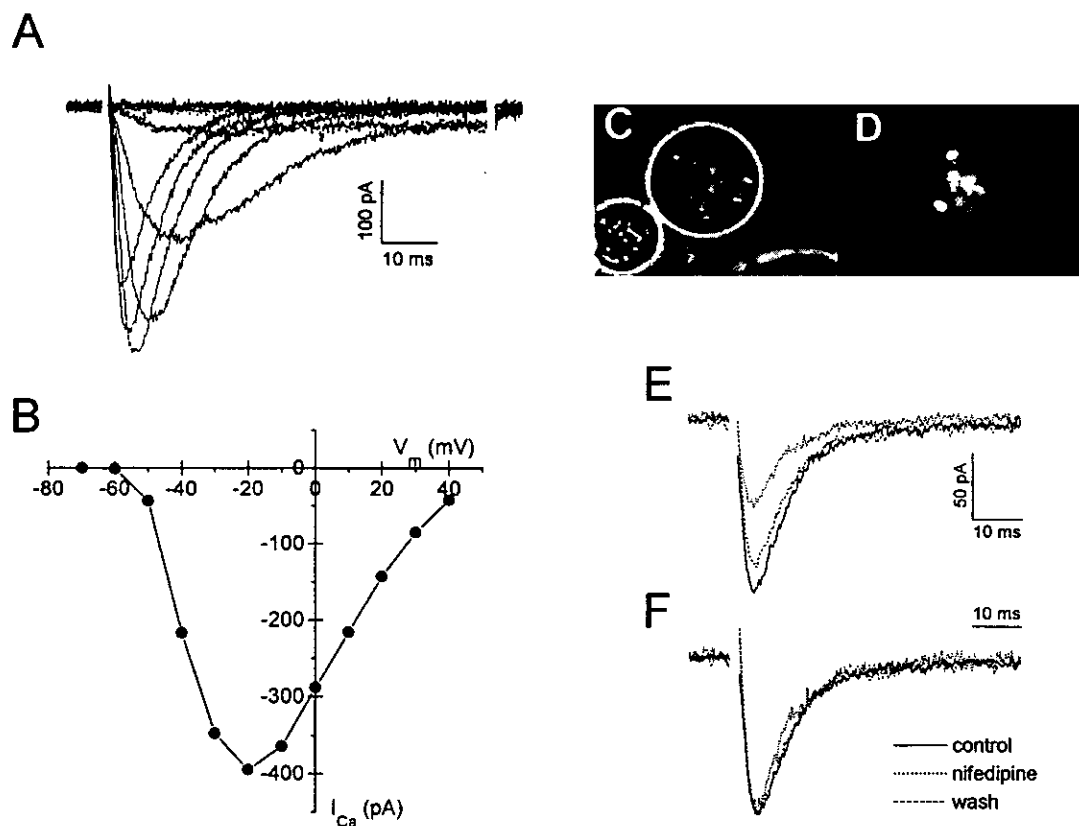


Fig. 3. (A) Family of Ca^{2+} currents recorded in primary spermatocytes from adult mice, evoked by stepping membrane potential to voltages between -70 and $+10$ mV, in 10 mV increments, from a holding potential of -80 mV. A portion of the non-compensated capacitive transients were blanked for clarity. (B) Current-voltage relationship obtained from a complete set of records, including those shown in A. (C,D) Micrographs of an acutely dissociated mouse spermatogenic cell in the pachytene stage of maturation obtained under phase contrast (C) and epifluorescence (D), after chromatin staining with the dye Hoechst 33342 at 1 $\mu\text{g/ml}$. (E,F) Acute effects of nifedipine application. Nifedipine (2 μM) was pressure-applied for 20 s onto the spermatogenic cell while Ca^{2+} currents were elicited by step depolarizations to -20 mV every 10 s. Nifedipine induced a rapid and partially reversible inhibition of Ca^{2+} currents. Superimposed traces were obtained before, during and after the application of nifedipine. (F) Traces represented in E were normalized and superimposed for comparison. Note that activation and inactivation kinetics are not affected by nifedipine application.

units [39]. The phenotypic expression of Ca^{2+} channels is thus a complex function of the cell's metabolic status, molecular repertoire, and specific isoforms being transcribed and translated [40]. Although the presence of Ca^{2+} channel α_1 subunit transcripts does not guarantee the functional expression of Ca^{2+} channels [25], the coexistence of α_{1E} transcripts and T-type Ca^{2+} channels in mouse spermatogenic cells may suggest that T-type channels arise from an α_{1E} subunit isoform in conjunction with other auxiliary subunits. Our results, however, do not rule out the possibility that T-type channels arise from an α_1 subunit other than those tested. There is also evidence suggesting the participation of at least two types of Ca^{2+} channels in the AR, both in the sea urchin [41] and in the mouse [42].

Mammalian spermatozoa must undergo changes after leaving the testis to become competent for fertilization. These changes occur in the male (epididymal maturation) and female reproductive tracts (capacitation and AR), and involve important variations in the ionic composition of the external media (reviewed in [6,43,44]). Increases in extracellular $[\text{K}^+]$ known to occur during the sperm's journey [45], could depolarize them and open voltage-dependent Ca^{2+} channels triggering premature exocytosis. Having T-type Ca^{2+} channels in unca-

pacitated sperm, which would be largely inactivated at their estimated resting membrane potential (around -40 mV; [46,47]), instead of L-type which would not be as inactivated, could therefore be a safeguard to contend with the environmental changes that occur during its maturation.

The following findings indicate that a T-type Ca^{2+} channel may be involved in the early events leading to the mammalian sperm AR: (a) the presence of mainly α_{1E} transcripts in pachytene spermatocytes, round and condensing spermatids (Fig. 2); (b) only T-type Ca^{2+} channels are functionally present in pachytene spermatocytes and round spermatids; (c) μM nifedipine is required to block both, the ZP3 induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the AR in mouse sperm, and the T-type Ca^{2+} currents of pachytene spermatocytes (Fig. 3); (d) similar Ni^{2+} concentrations block the mouse sperm AR [5], and T-type channels in pachytene spermatocytes.

T-type Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells have a low threshold, rapid inactivation and show steady-state inactivation in the -90 to -40 mV range [32]. As mentioned, at the mouse sperm resting membrane potential (~ -40 mV, [47,48]), a significant fraction of the spermatogenic T-type channels might be inactivated [30,33]. Interestingly, after capacitation, a process required by mammalian sperm to under-

go the ZP3-induced AR [3], the cells hyperpolarize to ~ -55 mV probably due to an increase in plasma membrane K^+ permeability [46,47]. In spite of this, capacitated sperm are unable to undergo AR upon depolarization by external K^+ addition [5], as would be expected if voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels were present, or if inactivation had been effectively removed from T-type channels by capacitation. Possibly, as in sea urchin sperm [48,49], a ZP3-induced hyperpolarization could be necessary in mouse sperm to further remove inactivation from T-type Ca^{2+} channels and allow them to open and induce AR. On the other hand, binding of ZP3 to its sperm receptor(s) may activate G proteins which directly, or indirectly through second messengers, could alter the voltage-dependence of T-type channels, opening them to trigger AR. Although many unknowns remain in the complex sequence of events leading to the AR, T-type Ca^{2+} channels may play a central role in the process.

Acknowledgements: This work was supported by grants to A. D., A. H. C. and A. L. from DGAPA and CONACyT. A. D. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

References

- [1] Hille, B. (1992) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 2nd Edn., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [2] Tsien, R.W. and Tsien, R.Y. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 715-760.
- [3] Yanagimachi, R. (1994) in: *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. and Neil, J. eds.) 2nd Edn., pp. 189-317. Raven Press, New York.
- [4] Florman, H., Tombes, R.M., First, N.L. and Babcock, D.F. (1989) *Dev. Biol.* 135, 133-147.
- [5] Florman, H., Corron, M.E., Kim, T.D.-H. and Babcock, D.F. (1992) *Dev. Biol.* 152, 304-314.
- [6] Ward, C. and Kopf, G. (1993) *Dev. Biol.* 158, 9-34.
- [7] Bellvé, A.R. (1993) *Methods Enzymol.* 225, 84-113.
- [8] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- [9] Armstrong, C. and Bezanilla, F. (1974) *J. Physiol.* 63, 533-552.
- [10] Chen, L.Q., Chahine, M., Kallen, R.G., Barchi, R.L. and Horn, R. (1992) *FEBS Lett.* 309, 253-309.
- [11] Darszon, A., Labarca, P., Beltrán, C., García-Soto, J. y Liévano, A. (1994) *Methods: a companion to Methods Enzymol.* 6, 37-50.
- [12] Liévano, A. and Darszon, A. (1995) in: *Cell Physiology Source Book* (Sperelakis, N. ed.) pp. 330-339, Academic Press, La Jolla, CA.
- [13] Guerrero, A., Sanchez, J.A. and Darszon, A. (1987) *FEBS Lett.* 220, 295-298.
- [14] Babcock, D.F., Bosma, M.M., Battaglia, D.E. and Darszon, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6001-6005.
- [15] Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Welner, J., Meller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. and Kaupp, B. (1994) *Nature* 368, 859-863.
- [16] Liévano, A., Vega y Sáenz de Miera, E. and Darszon, A. (1990) *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.
- [17] Cox, T. and Peterson, R.N. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 162-168.
- [18] Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P. and Liévano, A. (1994) *FEBS Lett.* 338, 23-26.
- [19] Tiwari-Woodruff, S. and Cox, T.C. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, C1284-C1294.
- [20] Labarca, P., Zapata, O., Beltrán, C. and Darszon, A. (1995) *Zygote* 3, 199-206.
- [21] Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A. and Darszon, A. (1996) *Dev. Biol.* 174, 271-280.
- [22] Tanabe, T. (1994) in: *Handbook of Membrane Channels. Molecular and Cellular Physiology* (Pacchia, C. ed.) pp. 177-186, Academic Press, San Diego, CA.
- [23] Stea, A., Wah Soong, T. and Snutch, T.P. (1995) in: *Handbook of Receptors and Channels. Ligand and Voltage-gated Ion Channels* (North, A. ed.) pp. 112-150, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [24] Kretzer, D.M. and Kerr, J.B. (1988) in: *The Physiology of Reproduction*, (Knobil, E. and Neil, J. eds.) pp. 837-932, Raven Press, New York.
- [25] Liévano, A., Bolden, A. and Horn, R. (1994) *Am. J. Physiol.* 36, C411-C424.
- [26] Schackmann, R.W., Eddy, E.M. and Shapiro, B.M. (1978) *Dev. Biol.* 65, 483-495.
- [27] García-Soto, J., González-Martínez, M.T., De la Torre, L. and Darszon, A. (1987) *Dev. Biol.* 120, 112-120.
- [28] Bean, B.P. (1989) *Annu. Rev. Physiol.* 51, 367-384.
- [29] Hess, P. (1990) *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 337-356.
- [30] Hagiwara, S. and Kawa, K. (1984) *J. Physiol. (Lond.)* 356, 135-149.
- [31] Fox, A., Nowicky, M.C. and Tsien, R.W. (1987) *J. Physiol. (Lond.)* 394, 149-172.
- [32] Santi, C., Darszon, A. and Hernandez-Cruz, A. (1996) *Biophys. J.* 70, A186.
- [33] Santi, C.M., Darszon, A. and Hernandez-Cruz, A. (1996) A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am. J. Physiol.*, in press.
- [34] Wah Soong, T., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R. and Snutch, T.P. (1993) *Science* 260, 1133-1136.
- [35] Bourinet, E., Stea, A., Soong, T.W. and Snutch, T.P. (1994) *Soc. Neurosci. Abstr.* 20, 70.
- [36] Ellinor, P.T., Zhang, J.F., Randall, A.D., Zhou, M., Schwartz, T.L., Tsien, R.W. and Home, W.A. (1993) *Nature* 363, 455-458.
- [37] Wakamori, M., Niidome, T., Mori, Y. (1993) *Soc. Neurosci. Abstr.* 19, 11.
- [38] Williams, M.E., Marubio, L.M., Deal, C.R., Hans, M., Brush, P.F., Phillipson, L.H., Miller, R.J., Johnson, E.C., Harpold, M.M. and Ellis, S.B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22347-22357.
- [39] Isom, L.L., De Jongh, K.S. and Catterall, W. (1994) *Neuron* 12, 1183-1194.
- [40] Stea, A., Wah Soong, T. and Snutch, T.P. (1995) *Neuron* 15, 929-940.
- [41] Guerrero, A. and Darszon, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19593-19599.
- [42] Florman, H. (1994) *Dev. Biol.* 165, 152-164.
- [43] Florman, H.M. and Babcock, D.F. (1991) in: *Elements of Mammalian Fertilization. I. Basic Concepts* (Wassarman, P.M. ed.) pp. 105-132, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [44] Bleil, J.D. (1991) in: *Elements of Mammalian Fertilization, vol. I* (Wassarman P.M. ed.) pp. 133-151, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [45] Jenkins, A.D., Lechene, C.P. and Howard, S.S. (1980) *Biol. Reprod.* 23, 981.
- [46] Espinoza, F. and Darszon, A. (1995) *FEBS Lett.* 372, 119-125.
- [47] Zeng, Y., Clark, E.N. and Florman, H.M. (1995) *Dev. Biol.* 171, 554-563.
- [48] González-Martínez, M.T. and Darszon, A. (1987) *FEBS Lett.* 218, 247-250.
- [49] González-Martínez, M.T., Guerrero, A., Morales, E., De la Torre, L. and Darszon, A. (1992) *Dev. Biol.* 150, 193-202.