

03081

3
2ey

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

UACPyP del CCH

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE CANALES IÓNICOS Y SU
PARTICIPACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA DEL
ESPERMATOZOIDE DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

FELIPE DE JESÚS ESPINOSA BECERRA

ASESOR: Dr. ALBERTO DARSZON ISRAEL

CUERNAVACA, MOR.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

270484



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.

PAGINACION

DISCONTINUA.

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia académica:

Beto, gracias por tus consejos y enseñanzas.

Carmen y Arturo, gracias por ayudar a iniciarme en esta hermosa profesión,
estamos con ustedes.

Oti, Miguel, Enrique, Marisa, William, Angelina, Esmeralda, Carla, Lalo, Blanca,
Daniel, Carlos, Nacho, Claudia, Carmen Judith, José Luis, Takuya, Gisela,
Gabriel, Ricardo Félix, Tony, Imelda, Rocío, Manolito, Doña Francis y Don Juan,
por su amistad, por su ayuda y por hacer más agradable mi estancia en este
laboratorio.

A mis amigos: Lucero, Adriana, Irma, Gabriel y Enrique, por su amistad y por
hacer tan agradable nuestro paso por la maestría.

Al honorable jurado, por los comentarios y sugerencias aportados.

A DGAPA-UNAM, a CONACyT, al SNI y a la Howard Hughes Medical
Institute, por sus donativos.

A mi familia (chica):

Paty, gracias por tu compañía, tu apoyo y comprensión.

Alonso, hijo, gracias por enseñarme a amar más la vida.

Ambos son mi más grande motivación.

A mi familia (grande):

Papito, gracias por el cariño y respeto que siempre me has dado.

Mami, gracias por darme la vida (te extraño).

Güicho, Emy, Pancho, Tita, Paty, Carlos, Jorge, Jando, Raquel, Lulú, Marthita,
Fernando y Yaneth, hermanos, gracias por todo, los quiero muchísimo.

Pilo, siempre estas en nuestros corazones.

A la familia Domínguez Cortinas, por su apoyo incondicional.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alberto Darszon Israel en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología/UNAM. Cuernavaca, Morelos.

ABREVIATURAS:

AC	Adenilil Ciclasa
AN	Ácido Niflúmico
AMPc	3', 5'-Monofosfato Cíclico de Adenosina
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ASB-D	Albúmina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Calcio Intracelular
CCDVs	Canales de Calcio Dependientes de Voltaje
CTs	Cinasas de Tirosina Solubles
DDF	1,9 Dideoxiforscolin
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGTA	Ácido Etilenglicol-bis(beta-amionetil eter) N,N,N',N'-Tetraacético
Em	Potencial de Membrana
Einv	Potencial de Inversion de la Corriente
FCE	<i>Factor de Crecimiento Epidermal</i>
g	Conductancia
GABA	Ácido Gamma-aminobutírico
R-GABA _A	Receptor de Ácido γ -aminobutírico tipo A
GMPc	3', 5'-Monofosfato Cíclico de Guanosina
HEPES	Ácido (N-[2-Hidoxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico])
hti-Ca	Hiperpolarización Transitoria Inducida por Ca ²⁺
IP3	Inositol 1, 4, 5-Trisfosfato
I	Corriente
I/V	Relación Corriente-Voltaje
[K ⁺] _e	Concentración Externa de Potasio
NPPB	Ácido 5-nitro-2(3-fenilpropilamino) benzoico
pA	Pico Amperios
pF	Pico Faradios
pHi	pH Intracelular
PKA	Protein Cinasa Dependiente de AMPc
PKC	Protein Cinasa Dependiente de Ca ²⁺
PKG	Protein Cinasa Dependiente de GMPc
PKT	Protein Cinasa de Tirosina
pS	Pico Siemens
PTX	Toxina Pertussis
RA	Reacción Acrosomal
R-IP3	Receptor de Inositol 1, 4, 5-Trisfosfato
ZP	Zona Pellucida

ÍNDICE

RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Reproducción sexual y gametogénesis.....	1
I.1.1 La reproducción sexual y sus ventajas (variabilidad genética).....	1
I.1.2 La generación del espermatozoide (espermatogénesis), y sus características morfológicas.....	3
- Morfolgia espermática.....	4
I.2 Capacitación, reacción acrosomal y los flujos iónicos.....	7
I.2.1 Capacitación y flujos iónicos.....	7
I.2.2 Reacción acrosomal y flujos iónicos.....	13
- Inductores de la RA.....	13
- Receptores a la ZP3.....	15
- Transducción de señales, flujos iónicos y su regulación durante la RA.....	15
- RA inducida con progesterona o con GABA.....	22
I.3 Transporte Iónico.....	24
I.3.1 Los canales iónicos.....	25
I.3.2 Receptor de GABA tipo A (R-GABA _A).....	27
- Características de las corrientes iónicas a través del R-GABA _A , su modulación y regulación.....	28
- Modelo estructural del R-GABA _A	29
I.3.3 Canal de Ca ²⁺ tipo T.....	31
I.4 Antecedentes Inmediatos (recapitulación).....	35
I.4.1 Canal de GABA tipo A y la RA.....	35
I.4.1.1 Fenamatos, sus efectos en el canal de GABA tipo A y la hti-Ca.....	36
I.4.2 Registro de canales iónicos presentes en la cabeza del espermatozoide por la técnica de patch-clamp.....	36

1.4.3 La albúmina y el colesterol, hipótesis de su función en capacitación y por qué probarlas en corrientes T.....	38
1.5 Objetivos.....	40
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
II.1. Reactivos.....	41
II.2. Obtención y capacitación de los espermatozoides.....	41
II.3. RA.....	41
II.3.1. Inhibición de la RA.....	41
II.3.2. Tinción del acrosoma.....	41
II.4. Mediciones de Potencial de Membrana por Fluorometría.....	42
II.4.1. Modulación de la hti-Ca por GABA y por el AN.....	43
II.5 Electrofisiología.....	44
II.5.1 Registro de canales unitarios del espermatozoide de ratón (estrategias para facilitar el sellado).....	45
- Hinchado del espermatozoide de ratón.....	46
II.5.2 Registro electrofisiológico de células espermatozógenas.....	49
II.6 Inmunodetección de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.....	51
II.7 Análisis estadístico.....	51
III RESULTADOS.....	52
III.1 Mediciones del potencial de membrana.....	52
III.1.1 Efecto de bloqueadores de canales aniónicos y del GABA sobre la hti-Ca.....	52
III.1.2 Cambios en el potencial de membrana durante la RA.....	55
III.3 Canales iónicos registrados por la técnica de patch-clamp.....	56

III.3.1 Canales catiónicos del espermatozoide.....	56
III.3.2 Canal aniónico del espermatozoide.....	58
III.3.3 Canales aniónicos en las células espermatozógenicas.....	60
III.4 Inhibición de la RA.....	61
III.5 Inhibición del canal de Ca²⁺ tipo-T en células espermatozógenicas por bloqueadores de canales aniónicos.....	62
III.6 Modulación de I_{Ca-T} en células espermatozógenicas por ASB.....	63
IV. DISCUSIÓN.....	72
IV.1 Canales catiónicos del espermatozoide y cambios en el potencial de membrana y en la [Ca²⁺]_i durante la RA.....	72
IV.2. Inhibición de flujos aniónicos y de la RA.....	73
IV.2.1. Efecto del GABA y de bloqueadores de canales de Cl⁻ sobre la h_{ti}-Ca.....	73
IV.2.2 Corrientes aniónicas unitarias en el espermatozoide.....	76
IV.2.3 Inhibición de la RA.....	77
IV.3 Modulación de Corrientes T por Albúmina.....	81
IV.3.1 Cambios en propiedades biofísicas de I_{Ca-T}, inducidos por ASB.....	81
IV.3.2 Posibles mecanismos de modulación de I_{Ca-T} por ASB e implicaciones fisiológicas para el espermatozoide.....	82
V. CONCLUSIONES.....	87
VI. PERSPECTIVAS.....	88
VII. REFERENCIAS.....	89
APÉNDICE: publicaciones derivadas de la presente tesis.....	99

RESUMEN:

El flujo de iones a través de las membranas celulares juega un papel fundamental en la fisiología de todas las células (desde bacterias hasta neuronas). El espermatozoide no es la excepción y, actualmente, buena parte de la investigación sobre fisiología espermática está encaminada a comprender como los canales iónicos regulan los eventos relacionados al proceso de fecundación. En el espermatozoide de mamífero, hay dos eventos que anteceden a la fecundación los cuales aumentan la eficiencia del proceso: la capacitación y la reacción acrosomal (RA). Durante ambos eventos hay incrementos en el pH intracelular (pHi) y en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y en la reacción acrosomal (RA) se sabe que están presentes eflujos de Cl^- . En este trabajo se describe el efecto de moduladores de canales de Cl^- (v.gr. ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido niflúmico (AN)) sobre la RA y sobre la hiperpolarización transitoria inducida por Ca^{2+} (hti-Ca), en espermatozoides de ratón suspendidos en medio sin Ca^{2+} . También presentamos registros de canal unitario en el espermatozoide de ratón, o de célula completa en células espermatogénicas, obtenidos por la técnica de patch-clamp. Los resultados: 1) sugieren la participación del receptor de GABA tipo A ($R-GABA_A$) en la RA y en la hti-Ca; 2) demuestran que en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide están presentes canales aniónicos sensibles al ácido niflúmico y canales catiónicos poco selectivos y 3) demuestran la potenciación de corrientes de Ca^{2+} tipo T de células espermatogénicas por albúmina sérica bovina. Al final, se discute el papel que cada uno de estos canales pueden estar jugando en la fisiología del espermatozoide.

SUMMARY:

The mammalian sperm must undergo two maturing events that allow a higher efficiency in the fertilization process: the capacitation and the acrosome reaction (AR). In these, and other physiologically relevant processes, ion fluxes are fundamental. During the capacitation and the AR, Ca^{2+} , and Cl^- fluxes are regulated by external molecules such as albumin and AR agonists. Here are described the effects of Cl^- channels modulators (i.e. GABA and niflumic acid (NA)) on mouse sperm AR, and on a recently described transient hyperpolarization triggered upon Ca^{2+} addition (Ca-ith) to sperm populations suspended in Ca^{2+} depleted media. Single channel recording of mouse sperm and whole-cell recording of spermatogenic cells, are also shown. Our results: 1) suggest the participation of the GABA_A -R during the AR, and the Ca-ith; 2) show the presence of anion channels sensitive to NA and of poorly selective cation channels on the plasma membrane of the head region of mouse sperm ; and 3) demonstrate that bovine serum albumin potentiates T-type Ca^{2+} currents on spermatogenic cells. The possible physiological relevance to sperm of these findings is discussed.

Caracterización de canales iónicos y su participación en la fisiología del espermatozoide de ratón.

I INTRODUCCIÓN.

Se sabe que los flujos iónicos a través de la membrana plasmática juegan un papel fundamental en la fisiología del espermatozoide. De especial interés para nosotros es el estudio de flujos iónicos durante la capacitación y durante la reacción acrosomal (RA) del espermatozoide de mamífero. Estos flujos se llevan a cabo a través de transportadores de membrana, como pueden ser canales iónicos, intercambiadores iónicos o ATPasas. El estudio de la identidad y farmacología de los transportadores de membrana (así como de su regulación) permite tanto la mejor comprensión de la fisiología del espermatozoide como la identificación de fármacos con posibles efectos anticonceptivos. Antes de pasar de lleno al tema principal de esta tesis vale la pena preguntarse: ¿cuál es la importancia biológica del espermatozoide y cómo se genera esta célula?

I.1 Reproducción sexual y gametogénesis.

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada que tiene como función la de fecundar al ovocito. Ambos gametos (tanto el espermatozoide como el ovocito) sólo se encuentran en especies que se reproducen sexualmente. En términos evolutivos, habiendo especies que se reproducen asexualmente con alta eficiencia, ¿por qué apareció la reproducción sexual y de qué ventajas provee a las especies que la ejercen?

I.1.1 La reproducción sexual y sus ventajas (variabilidad genética).

Desde el punto de vista de la conservación de las especies, estas tienen 2 opciones reproductivas para evitar su extinción: la reproducción asexual y la sexual. Algunos organismos tienen la capacidad de utilizar ambos mecanismos de reproducción, y aún en esos casos, uno de los mecanismos es el más socorrido. Las especies que preferentemente se reproducen asexualmente son organismos con menor diversidad genética que las especies que se reproducen

sexualmente (Alberts et al., 1994). Estos organismos no requieren de la intervención de algún otro individuo de su misma especie para la generación de un nuevo ser, lo que a su vez, trae como consecuencia que el individuo generado sea genéticamente "idéntico" a su progenitor. A diferencia de esto, la reproducción sexual requiere de la participación de 2 progenitores (excepto en hermafroditas) y resulta en la generación de individuos con gran variabilidad genética. De hecho, dentro de una misma especie con capacidad de reproducción tanto asexual como sexual, hay mayor diversidad genética en subespecies en las que predomina la reproducción sexual (Purdy y Bayer, 1996). La reproducción sexual provee además de ventajas en la selección contra genes deletéreos (Hurst y Peck, 1996; Chao, 1997; de Visser, et al., 1997). Por otro lado, evidencias recientes sugieren que al menos parte de los mecanismos (y de los genes) implicados en la determinación sexual están conservados entre especies tan distantes como el humano y el nemátodo *C. elegans* (Raymond et al., 1998). Con base a lo anterior, se piensa que la reproducción sexual se ha favorecido evolutivamente ya que, a su vez, esta da ventajas a las especies que la ejercen al generar poblaciones con diferentes opciones adaptativas en un hábitat altamente cambiante. En contraposición, hay científicos que piensan que el sexo en los animales apareció "casualmente" y que se ha mantenido no por suponer una ventaja evolutiva, sino por estar acoplado al proceso reproductivo (Sagan y Margulis, 1985).

Pero, ¿qué es la reproducción sexual? En términos llanos, la reproducción sexual consiste en la combinación de material genético de 2 individuos de la misma especie. Se lleva a cabo mediante la fusión de 2 gametos (fecundación) donde la mitad de los cromosomas de la nueva célula o embrión proviene del gameto femenino (ovocito) y la otra mitad del gameto masculino (espermatozoide). Los gametos son células sexuales haploides generadas por medio de divisiones meióticas a partir de células diploides (gametogénesis). Durante el proceso meiótico existe intercambio de genes entre cromosomas homólogos (recombinación genética) multiplicando las posibilidades de variabilidad genética en las especies que se reproducen sexualmente. La fusión de estas células trae consigo la "recuperación" de la carga genética ($2n$) en una célula (embrión) con capacidad de división mitótica y de diferenciación celular que finalmente permitirá la generación de tejidos y de un nuevo individuo (Gilbert et al., 1994). Una vez sentada la importancia reproductiva y evolutiva del espermatozoide, pasemos a ver como es que se generan estas células y algunas de sus características.

I.1.2 La generación del espermatozoide (espermatogénesis), y sus características morfológicas.

La gametogénesis masculina o espermatogénesis, consiste en una serie de divisiones celulares (tanto del tipo mitótico como meiótico), acompañadas de metamorfosis hacia las últimas etapas (espermiogénesis). De este proceso resultan los espermatozoides que son células móviles con escaso citoplasma (volumen total ~ 35 fl; Kleinhans et al., 1992), algunos pocos organelos y de núcleo haploide supercondensado (figuras 1 y 2). En el mamífero, la espermatogénesis se lleva a cabo en forma cíclica durante toda la vida del individuo sexualmente maduro y se caracteriza por las siguientes etapas (y tipos celulares asociados perfectamente definidos): (1) autorenovación de células germinales por el proceso de mitosis (espermatogonias), (2) la reducción del número cromosómico por medio de la meiosis (espermatocitos primarios y secundarios), y (3) la espermiogénesis (espermátides y espermatozoides) (Krester y Kerr, 1988 ; Garner y Hafez, 1989). Además de las células germinales, la participación de otros tipos celulares (células de Leydig y de Sertoli), que contribuyen con factores hormonales y nutricionales, es indispensable para que se lleve a cabo la espermatogénesis. A continuación se describen brevemente las características de las células germinales durante las diferentes etapas de la espermatogénesis enfatizando sobre todo en aspectos de la espermiogénesis y de la morfología espermática.

Espermatogonias. Las espermatogonias además de ser las responsables de generar los tipos celulares de las etapas meióticas (espermatogonia tipo B), tienen que autorenovar su población (espermatogonia tipo A1) (Krester y Kerr, 1988; Garner y Hafez, 1987). Todas las divisiones celulares en estas etapas tempranas de la espermatogénesis son del tipo mitótico. Las espermatogonias están interconectadas por puentes citoplasmáticos. Los puentes citoplasmáticos son estructuras dinámicas de diámetro variable que aparecen y desaparecen a lo largo de la espermatogénesis (Weber y Russell, 1987; Russell et al., 1987). Los puentes citoplasmáticos resultan de citoquinesis incompletas y permiten el paso de metabolitos de alto peso molecular como proteínas y RNAm. Gracias a esto, las células dentro de una misma etapa meiótica a pesar de ser genéticamente distintas son fenotípicamente equivalentes, permitiendo así el desarrollo coordinado de las células germinales como grupo (Braun et al., 1989; figura 1).

Espermatocitos. Se dividen en primarios y secundarios y están involucrados en la meiosis. En la primera división meiótica los espermatocitos primarios duplican su DNA y el número de cromosomas resultando en cromátides dobles las cuales se aparean con sus homólogas llevándose a cabo el entrecruzamiento o recombinación genética. Al dividirse, cada célula hija (espermatocito secundario) recibe la mitad de los cromosomas pero que, por ser cromátides dobles, siguen conservando una carga genética $2n$. Los espermatocitos secundarios vuelven a dividirse pero en este caso la citocinesis no se acompaña de una duplicación previa del DNA con lo que las células resultantes (espermátides) tendrán $1/2$ de la carga genética (n).

Espermiogénesis. La observación del desarrollo acrosómico por medio de la tinción de PAS (ácido periódico de Schiff) ha permitido describir 4 fases de la espermiogénesis: de Golgi, del capuchón, la acrosómica y la espermiación (Krester y Kerr, 1988; Duane et al., 1989). La serie de cambios morfológicos (sin divisiones celulares) durante la espermiogénesis, resulta en la transformación de una célula esférica (espermátide redonda) en una célula alargada con la formación de organelos nuevos como el acrosoma y el flagelo, reorganización y eliminación de la mayor parte de citoplasma y organelos y supercondensación del material genético (figura 2). El material genético supercondensado junto con cambios importantes en el citoesqueleto dan al núcleo y al acrosoma la forma característica de la cabeza del espermatozoide en cada especie. Se piensa que el acrosoma se deriva a partir del aparato de Golgi. El citoplasma se desplaza por medio de filamentos (manchete) que se extienden a partir de la membrana nuclear caudal. En la última fase (espermiación), se elimina la mayor parte del citoplasma (incluido el Aparato de Golgi, microtúbulos del manchete, mitocondrias, ribosomas, etc.), como parte del cuerpo residual que fagocitan las células de Sertoli (figura 1). Al final de la espermiación el espermatozoide se libera al lumen del túbulo para comenzar su travesía (y maduración final) a través del tracto reproductor masculino. La espermatogénesis dura alrededor de 20 a 45 días según la especie.

Morfología espermática. Anatómicamente hablando el espermatozoide está formado por la cabeza y el flagelo unidos por una pieza conectora o cuello (figura 2). La cabeza es aplanada y tiene dimensiones de $\sim 5 \times 3 \times 1 \mu\text{m}$ (largo, ancho y espesor) en el espermatozoide de ratón. La cabeza a su vez comprende el núcleo, el acrosoma, un citoesqueleto muy especial que le da rigidez y forma, y un poco de citoplasma, todo esto rodeado por la membrana plasmática. El núcleo del espermatozoide ocupa la mayor parte del volumen de la cabeza (excepto en especies

con acrosoma muy prominente). El DNA del espermatozoide está muy compactado. Esto se consigue gracias a la intervención de ciertas histonas básicas específicas del espermatozoide conocidas como protaminas (Hecht, 1990; Santi et al., 1994) cuya deficiencia es causante de esterilidad (de Yebra et al., 1993). Estas proteínas son ricas en argininas y cisteínas y forman numerosos puentes disulfuro. El tamaño del acrosoma y la superficie adherida al núcleo varía enormemente entre las diferentes especies. En algunas especies abarca una zona anuclear muy grande (cuyo) y en otras está íntimamente adherido al núcleo sin zona prenuclear alguna (ratón). El acrosoma comprende 2 regiones, la craneal y la ecuatorial. Así mismo, la membrana acrosomal se clasifica en acrosomal interna (adherida al núcleo) y en membrana acrosomal externa (la adyacente a la membrana plasmática). Estas varían en su función y composición. Durante la exocitosis acrosomal, la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática

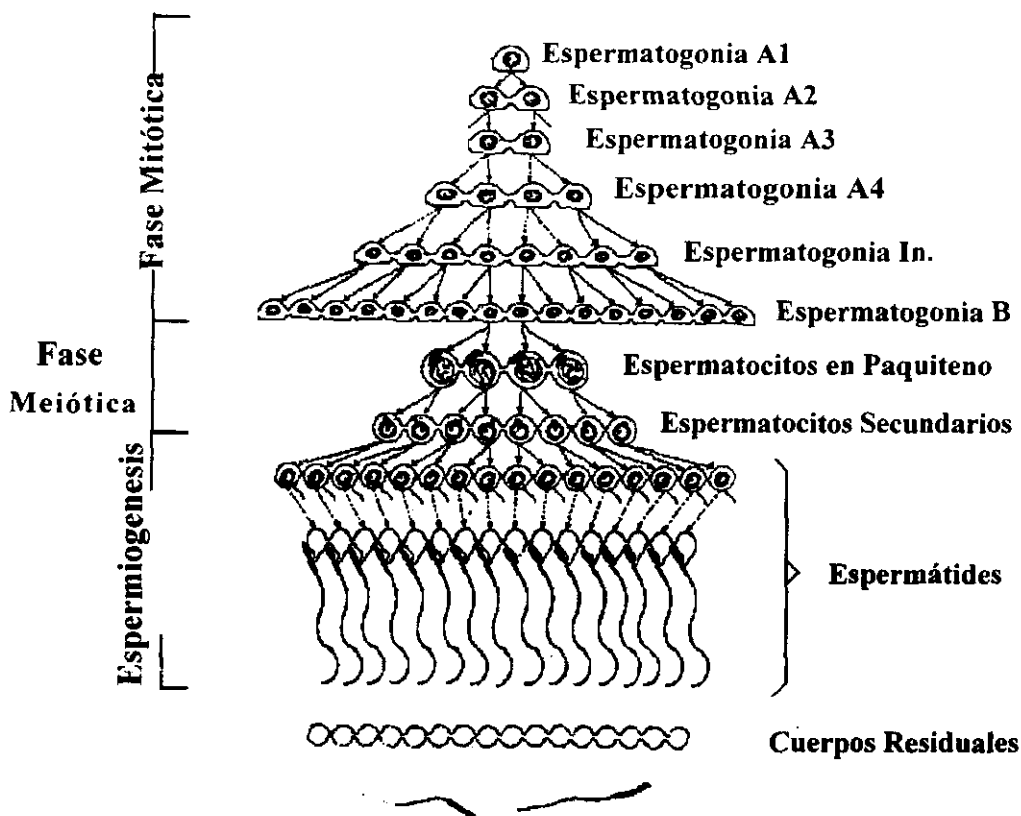


Figura 1. Espermatogénesis. Esquema de los diferentes tipos celulares presentes en forma secuencial en el ciclo espermatogénico y de la metamorfosis que sufren las espermátidas redondas para transformarse en el espermatozoide maduro. Se destaca el carácter clonal de cada etapa (Tomado de Hafez, 1989).

formando las llamadas vesículas híbridas. En dicha fusión participa una matriz glicoproteica adyacente a su superficie interna (Yanaguimachi, 1994; McLescky et al., 1998). Hacia la región ecuatorial, la membrana acrosomal externa contiene la proteína fertilina la cual participa en la fusión del espermatozoide con el óvulo. La membrana acrosomal interna contiene una fracción membranal de hialuronidasa, la proteína PH-20 y proacrosina; esta membrana participa en la unión secundaria (ver abajo). Además, el acrosoma contiene una matriz de enzimas hidrolíticas que, entre otras cosas, ayudan a la penetración de las capas externas del óvulo. Algunas de estas enzimas son específicas del acrosoma como la hialuronidasa espermática y la acrosina. También contiene enzimas como fosfolipasas, colagenasas, catepsina D, calpaína II, fosfatasa ácida y otras numerosas glicosidasas diferentes de la hialuronidasa. El flagelo o cola está comprendido por cuatro segmentos o piezas y son: la conectora o cuello, la media, la principal y la final o terminal. A lo largo de las últimas tres piezas se encuentra el axonema que es un grupo de microtúbulos

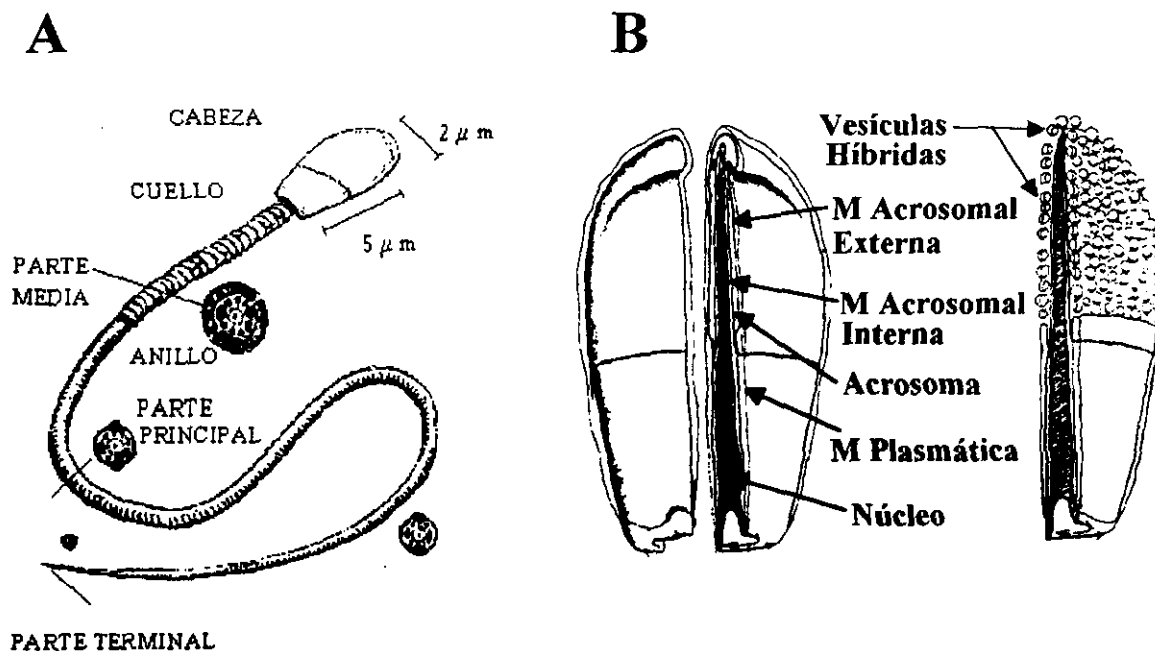


Figura 2. Morfología del espermatozoide de toro y esquema de la exocitosis acrosomal. A) Muestra las cuatro porciones anatómicas del espermatozoide (incluidos cortes transversales), que son: la cabeza (destacando el capuchón acrosómico), el cuello, la pieza media (que muestra la vaina mitocondrial) y la parte principal del flagelo (con su axonema central de 9 + 2 microtúbulos). B) Esquema de la exocitosis acrosomal. A la izquierda la relación que existe entre el núcleo y la membrana acrosomal interna y entre la membrana acrosomal externa y la plasmática. A la derecha se muestra un espermatozoide reaccionado en el que las vesículas híbridas se forman por la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Tomado de Hafez, 1989).

dispuestos en orden de 9+2 pares y que son el aparato m6til del espermatozoide. En la pieza media adem6s est6 dispuesto, en forma ordenada, un grupo de mitocondrias.

I.2 Capacitaci6n, reacci6n acrosomal y los flujos i6nicos.

El espermatozoide, resultado de la espermatog6nesis, sufre una serie de cambios que ayudan a completar su maduraci6n. Esto ocurre parcialmente al pasar por el epid6dimo, en donde adquiere su capacidad motriz y mayor eficiencia fecundante (Yanaguimachi, 1994). Adem6s de esta maduraci6n parcial, durante el proceso reproductivo natural en el espermatozoide de mam6fero, hay dos eventos fisiol6gicos secuenciales que anteceden a la fecundaci6n y que, en conjunto, hacen m6s eficiente este proceso: la capacitaci6n y la RA. A continuaci6n describiremos los eventos moleculares y flujos i6nicos que se presentan asociados a la capacitaci6n y a la RA

I.2.1 Capacitaci6n y flujos i6nicos.

En los a6os 50s Chang y Austin, (citados por Yanaguimachi, 1994) observaron en forma independiente que los espermatozoides de mam6fero reci6n eyaculados o los recolectados del epid6dimo no fecundan a los ovocitos. Observaron tambi6n que los espermatozoides deben permanecer un lapso de tiempo en el tracto reproductor femenino o incubados *in vitro* para adquirir dicha capacidad y llamaron "capacitaci6n" a este proceso. El tiempo que debe permanecer el espermatozoide en el tracto reproductor femenino var6a entre especies, entre individuos de la misma especie o, inclusive en espermatozoides del mismo individuo provenientes de diferentes regiones del tracto reproductor masculino. A trav6s de los a6os, el concepto sobre capacitaci6n se ha ido modificando y actualmente se consideran como parte de la capacitaci6n a todos aquellos procesos que preparan al espermatozoide para sufrir la RA inducida por las capas externas del 6vulo u otros inductores como la progesterona (Visconti y Kopf, 1998). En forma natural, los componentes de los fluidos del tracto reproductor femenino promueven la capacitaci6n (Lakoski et al., 1988, Yanaguimachi 1988). *In vivo* la capacitaci6n se completa en la regi6n del istmo y s6lo algunos espermatozoides pasan a la zona de fecundaci6n (la uni6n istmo-6mpula). Se cree que secreciones sitio espec6ficas determinan la migraci6n de los espermatozoides y su capacitaci6n en el oviducto (Shalgi y Phillips, 1988; Demott y Su6rez, 1992;

Ortiz et al., 1995). Estos mecanismos en conjunto aseguran la presencia, en número y estado fisiológico, de los espermatozoides "más aptos" para la fecundación en el momento requerido.

La capacitación también se puede llevar a cabo experimentalmente al incubar espermatozoides en medios salinos definidos. Los requerimientos en la composición de estos medios difiere entre especies. Por ejemplo, en ratón es importante incluir albúmina sérica y glucosa en el medio de capacitación (Ward et al., 1982) y en bovinos estos componentes se substituyen por heparina y fructosa (Florman et al., 1988; Parrish et al., 1988). Es más, la presencia de glucosa en el medio capacitante inhibe la capacitación del espermatozoide de toro (Parrish et al., 1994) al parecer aboliendo cambios en pH_i y afectando el metabolismo del AMPc y la fosforilación de proteínas (ver abajo) (revisado en Visconti y Kopf, 1998) . En el espermatozoide de humano tanto la heparina (Valencia et al., 1984) como la albúmina (Blackmore et al., 1990) pueden usarse para capacitación. Se sabe que la inducción de la capacitación *in vitro* presenta algunas diferencias con la capacitación *in vivo*. La capacitación de espermatozoides de toro inducida en presencia de fluido oviductal del estro o en presencia de heparina, difiere en susceptibilidad a inhibidores como el sulfato de protamina (Parrish et al., 1994). Estos datos sugieren que se pueden activar mecanismos diferentes del proceso fisiológico durante la capacitación *in vitro*, por lo que habrá que interpretar con cautela los resultados experimentales al extrapolarlos a la situación natural. En este sentido, la tendencia a mediano plazo deberá ser la mimetización bioquímica de los fluidos uterinos y oviductales más fielmente, tanto para la realización de experimentos de capacitación y RA, así como para la fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (Menezo y Guerin, 1997).

Bioquímicamente hablando, la capacitación es un proceso reversible que correlaciona con cambios en la motilidad, en el metabolismo del espermatozoide, en la membrana plasmática (composición, topografía de componentes y fluidez) y en la concentración intracelular de iones y segundos mensajeros (Yanaguimachi, 1994; Florman y Babcock, 1991). Recientemente se ha determinado que durante la capacitación también se suscitan cambios en la fosforilación de proteínas espermáticas (Visconti et al., 1995 a,b; Baldi et al., 1996). El espermatozoide adquiere su capacidad motriz a su paso por el epidídimo (Yanaguimachi, 1994) y durante la capacitación la motilidad del espermatozoide cambia en patrón y vigor. A este cambio en las cualidades motrices se le conoce como hiperactivación y en forma natural los fluidos presentes en la región de la

fecundación lo inducen (Falcone et al., 1991; Fetterolf et al., 1994). La hiperactivación depende de cambios en pH_i , $[Ca^{2+}]_i$ y AMPc (Babcock et al 1983; Lindeman y Kanous, 1989; White y Aitken., 1989; Mei, et al., 1997) y su importancia parece radicar en que facilita la penetración a través de las capas externas del óvulo más que propiamente en el transporte del espermatozoide a través del tracto femenino (Hafez, 1989). De hecho, una hiperactivación deficiente es causante de baja fertilidad. En relación al metabolismo, durante la capacitación aumentan el consumo de oxígeno y la actividad glicolítica de la célula (Babcock et al., 1983; Coronel y Lardy, 1987).

A nivel de la membrana plasmática se observan cambios de índole diverso. Mediante estudios inmunocitoquímicos se ha determinado que el patrón antigénico del espermatozoide cambia después de la capacitación; algunos antígenos desaparecen y otros aparecen (Davis et al., 1981; Myles, et al., 1987). Los rearrreglos en la membrana plasmática durante la capacitación se pueden clasificar en cuanto a la composición química del compuesto, en cuanto a su asociación con la membrana y en cuanto a su distribución en la misma. Algunos de estos compuestos están integrados a la membrana (PH-20, PH-34, colesterol) y otros más son de origen externo (caltrina, adhesinas espermáticas) y se adhieren a ella por fuerzas electrostáticas principalmente (Ruffo et al., 1983; Myles et al., 1987; Coronel et al., 1992; Boue et al., 1996). Así mismo, se ha observado que la cantidad y distribución de algunos de estos compuestos cambia durante la capacitación (Villaroya y Scholler, 1987; Jones et al., 1990; Toopfer Petersen, et al., 1990). Spungin et al. (1995) reportaron la traslocación de una proteína de 70 kDa de la membrana acrosomal externa a la membrana plasmática durante la capacitación del espermatozoide de toro. Esta proteína participa en la interacción del espermatozoide con las capas extracelulares del ovocito y podría estar involucrado en la inducción de la RA.

Entre otras cosas, la reestructuración de la membrana conlleva a cambios en su fluidez y su permeabilidad iónica. Tanto el colesterol como otros lípidos modulan proteínas de membrana entre las que se encuentran receptores, ATPasas y canales iónicos (Toro y Stefanie, 1991; Sunshine y McNamee, 1994; Bastiaanse, et al., 1997; Ryan et al., 1997). El fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina aumentan durante el proceso capacitativo. Los metabolitos relacionados como el DAG, IP3, y los lisofosfolípidos, podrían estar involucrados en los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, fosforilación de proteínas (durante la capacitación y la RA) y en la fusión de membranas (durante la RA). En el espermatozoide se ha demostrado que la PLA2 y la PLC γ 1 participan en el

metabolismo de estos compuestos (Baldi et al., 1996). Uno de los fenómenos mejor conocidos de la capacitación es la disminución de colesterol en la membrana plasmática. Se piensa que esta depende de la presencia de factores uterinos que "secuestran" el colesterol (Langlais et al., 1988). *In vitro*, se incluye albúmina sérica con este propósito en los medios capacitantes en diversas especies (Go y Wolf, 1985, Suzuki y Yanaguimachi, 1989) y posiblemente participe junto con otros compuestos uterinos en el proceso natural (Visconti y Kopf, 1998). El colesterol da cierta rigidez a las membranas (Bastiaanse et al., 1997) y se piensa que la disminución del colesterol durante la capacitación podría estar aumentando la fluidez de la membrana y su permeabilidad al Ca^{2+} y al HCO_3^- . La presencia de estos dos compuestos en el medio extracelular y su incremento en el citosol son esenciales para la capacitación (Shi y Roldán, 1995; Visconti et al., 1995 a,b; Visconti y Kopf, 1998).

Se ha demostrado que durante la capacitación, el Ca^{2+} participa en la regulación de la calmodulina, las cinasas, las fosfolipasas y, junto con el HCO_3^- , parecen modular a la adenilato ciclasa (AC) y los niveles de AMPc (Garty y Salomon, 1987; Visconti et al., 1990). En el espermatozoide de humano el Ca^{2+} intracelular aumenta alcanzando una meseta a los 90-120 min. de iniciada la capacitación (Baldi et al., 1991; Das Gupta et al., 1993) y la heparina induce incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en bovino (Córdoba et al., 1997). En ambos casos el origen del Ca^{2+} es extracelular. El uso de la heparina en bovino también correlaciona con los aumentos en pHi, AMPc y en la fosforilación de proteínas (Visconti y Kopf, 1998), pero a diferencia de la albúmina sérica bovina (ASB), parece ejercer su efecto vía un receptor membranal y no mediante la remoción del colesterol de la membrana.

Actualmente se desconoce cuál es la importancia de las pozas internas de Ca^{2+} en la regulación de la capacitación. Se tienen evidencias de que la capacitación puede acelerarse usando compuestos que inducen liberación de Ca^{2+} como la tapsigargina (Mendoza y Tesarik, 1993), aunque se desconoce cual pueda ser su relevancia fisiológica. En este contexto, el receptor a IP_3 (Walensky y Snyder, 1995; Treviño et al., 1998) y la calreticulina (Nakamura et al., 1993) se han localizado en membrana y matriz acrosomal, respectivamente. Los incrementos en AMPc, durante la capacitación, correlacionan a su vez con aumento en fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. El uso de inhibidores específicos para diferentes enzimas sugiere que este mecanismo involucra la estimulación de PKA por AMPc la cual a su vez activa a cinasas

de tirosina solubles (CTSs) que finalmente son las encargadas en fosforilar residuos de tirosina (Baldi et al., 1996; Visconti y Kopf, 1998). Las proteínas fosforiladas comprenden un rango amplio de pesos moleculares de entre 20 y 200 kDa en las diferentes especies (Leyton y Saling, 1989; Visconti et al., 1995 a,b; Luconi et al., 1996; Emiliozzi y Fenichel., 1997; Galantino et al., 1997). Sólo en algunos casos se conoce la identidad de estas proteínas. Una de ellas es una proteína de 95 kDa que se postula es un receptor tipo cinasa de tirosina que participa en la unión a la ZP y en la inducción de la RA (Baldi et al., 1996). Otras proteínas, fosforiladas por una tirosin cinasa de 42 kDa, son la histona H2A y una proteína asociada a microtúbulos (Berruti, 1994), sugiriendo que durante la capacitación se prepara (o se inicia) la descondensación del pronúcleo masculino. Es interesante destacar que los espermatozoides de la porción inicial del epidídimo (cabeza del epidídimo), que aún no han alcanzado la suficiente maduración para capacitarse, no presentan los incrementos en fosforilación en condiciones capacitantes como sucede para los espermatozoides maduros (Visconti et al., 1995a).

Los cambios en pHi son muy importantes en la fisiología de todas las células ya que modulan múltiples enzimas y también canales iónicos. En reposo, el pHi cambia en forma casi lineal con los cambios de pHe en espermatozoides de ratón y de toro (Gati et al., 1993; Zeng et al., 1996). Se ha demostrado que la motilidad flagelar (Lindemann y Kanous, 1989) y que la actividad de canales de Ca^{2+} y de la AC espermáticos se favorece a pH alcalino (Babcock y Pfiffer, 1987). Durante la capacitación, el pHi aumenta en el espermatozoide de toro (Uguz et al., 1994; Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995) y de ratón (Zeng et al., 1996). En el ratón se sabe que el incremento en pHi se lleva a cabo mediante un mecanismo dependiente de Na^+ , Cl^- y HCO_3^- . En contraste, en el hamster no se detectó incremento alguno en el pHi durante la capacitación (White y Aitken, 1989). En el espermatozoide de toro, la inhibición de la fosforilación de proteínas con inhibidores de PKA no tuvo efecto alguno sobre el incremento en el pHi durante la capacitación (Galantino et al., 1997). Esto sugiere que el incremento de pHi es previo a la activación de la PKA. En este contexto, se podría proponer un modelo en donde el pHi alcalino junto con el Ca^{2+} activan a la AC con las consecuencias arriba descritas sobre el AMPc, las cinasas y la fosforilación de proteínas. En contraposición a este modelo, Visconti et al. (1995), demuestran que el incremento de pHe (que ejerce una influencia importante sobre el pH interno) no sustituye a la depleción de HCO_3^- en mantener la fosforilación en el ratón, indicando que la activación de la AC

por HCO_3^- es directa y no porque este compuesto module la alcalinización citoplásmica. Estos resultados apuntan a que la activación de la AC (junto con la subsecuente fosforilación de proteínas) y los incrementos del pHi durante la capacitación, son eventos independientes. Por el momento, el papel causa-efecto del aumento de pHi durante la capacitación requiere de mayor investigación (Baldi et al., 1996).

En condiciones capacitantes, el K^+ es el ión que mayor influencia tiene sobre el potencial de membrana del espermatozoide. En el toro y el ratón, el potencial de reposo es de -30 a -45 mV en el espermatozoide no capacitado y, debido a un aumento en la permeabilidad al K^+ , durante la capacitación se hiperpolariza llegando a valores de alrededor de -60 mV (Espinosa y Darszon., 1995; Zeng et al., 1995). Es posible que esta hiperpolarización estimule a la AC del

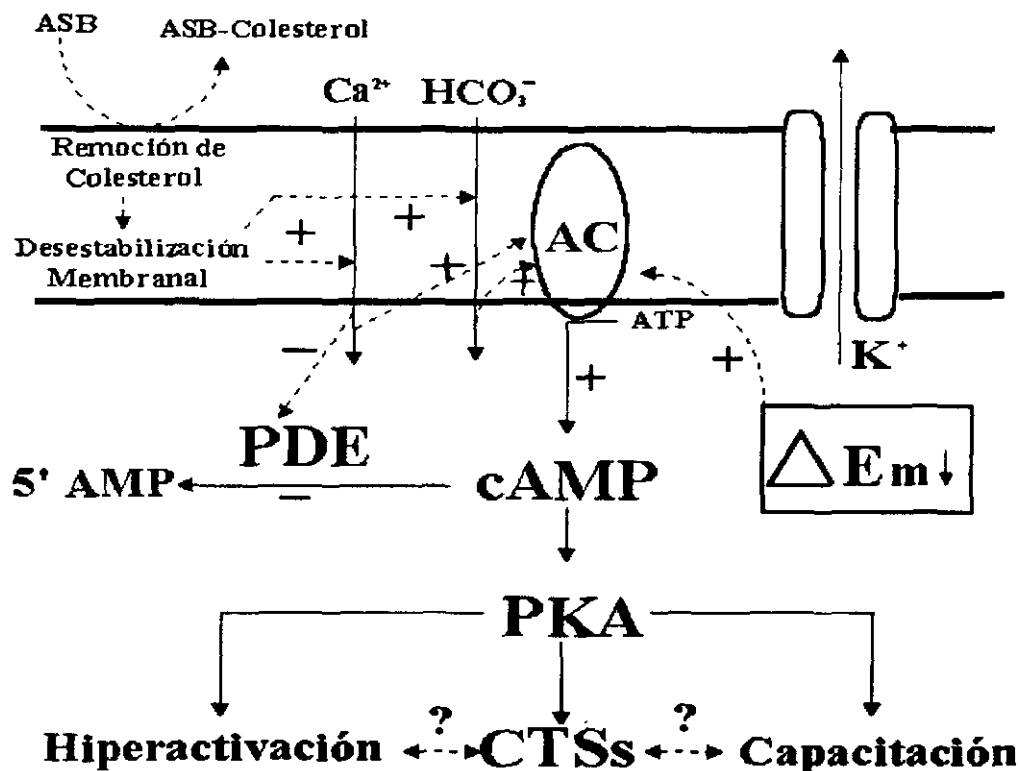


Figura 3. Fosforilación en residuos de tirosina durante la capacitación. La ASB secuestra el colesterol de la membrana plasmática induciendo cambios en su permeabilidad al Ca^{2+} y al HCO_3^- . Por otro lado, durante la capacitación aumenta la permeabilidad al K^+ provocando una hiperpolarización. Ambos fenómenos estimulan a la AC, se elevan los niveles de AMPc y se activa PKA, la cual regula a la hiperactivación, la capacitación y la fosforilación en residuos de tirosina vía cinasas de tirosina solubles (CTSs). (+) = estímulo; (-) = inhibición (Modificado de Vsiconti et al., 1995b).

espermatozoide de ratón (Pablo Visconti, comunicación personal) en forma similar al espermatozoide de erizo de mar (Beltrán et al., 1996). Esto traería consigo el aumento en el AMPc y la fosforilación de proteínas inducidas durante la capacitación. Otra posible función de la hiperpolarización podría ser la regulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), en especial, el canal de Ca^{2+} tipo T registrado en células espermatogénicas (Arnoult et al., 1996; Liévano et al., 1996, Santi et al., 1996) y que, por evidencias indirectas, se cree está presente también en el espermatozoide (ver discusión). En la figura 3 se muestra un modelo de la capacitación *in vitro* en el espermatozoide de ratón (modificado de Visconti et al., 1995b). En resumen, en este modelo se involucran aspectos de la remoción de colesterol membranal por la albúmina, la activación de AC por Ca^{2+} , y HCO_3^- , y la modulación de la fosforilación de proteínas por interacciones entre AMPc, PKA y CTSs.

1.2.2 Reacción acrosomal y flujos iónicos.

Inductores de la RA. La RA es un evento de excitación que se dispara específicamente cuando el espermatozoide entra en contacto con las capas extracelulares del ovocito. Durante la RA, la membrana acrosomal externa se fusiona con la plasmática formando las vesículas híbridas y liberando enzimas hidrolíticas que ayudan a la penetración de dichas capas (figura 2b). En el mamífero, la capa extracelular que rodea al ovocito se conoce como zona pelúcida (ZP). El ratón es la especie en la que se inició la caracterización de la ZP (Saling y Storey, 1979; Bleil y Wassarman 1980) y aún ahora, es la especie de la que más se sabe. La ZP está constituida por diferentes clases de glicoproteínas que se han clonado en gato, vaca, humano, cerdo, conejo y ratón y están altamente conservadas (McLesky et al., 1998). Se clasifican en familias de ZP1, ZP2, y ZP3 por la homología que guardan con las de ratón (65-99% de homología entre las ZP3 de diferentes especies). Estructuralmente hablando, en el ratón la ZP es una esponja de filamentos formados por homodímeros de ZP1 (200kDa) que entrecruzan heterodímeros de ZP2 (120 kDa) y ZP3 (83 kDa). De éstas sólo la ZP2 y la ZP3 interaccionan específicamente con el espermatozoide.

En la asociación del espermatozoide con el ovocito se distinguen 3 tipos de unión, las cuales son secuenciales y varían en la especificidad de las moléculas participantes y en su función. En las uniones primaria y secundaria participan, por un lado, receptores específicos del

espermatozoide, y por otro lado, la ZP3 y la ZP2, respectivamente. En la unión primaria, la ZP3 se une a varios receptores del espermatozoide localizados en la membrana plasmática y como consecuencia se dispara la RA. En la unión secundaria, la ZP2 interacciona con receptores localizados en la membrana acrosomal interna (PH-20 y proacrosina-acrosina) que además participan en la penetración a través de la ZP. La tercera unión está dada entre receptores del espermatozoide llamados fertilinas, localizadas en la región ecuatorial del acrosoma, y receptores del ovocito del tipo integrina culminando en la fusión de las membranas de ambas células (Evans et al., 1997a,b; McLesky et al., 1998). A continuación describimos aspectos de la unión primaria por estar directamente relacionada con la inducción de la RA.

La unión primaria se da entre espermatozoides capacitados (no reaccionados) y la ZP de ovocitos no fecundados. Por el contrario, cuando los espermatozoides se exponen a ZP de ovocitos fecundados se adhieren laxamente, no sufren la RA y no la penetran. Estas características se consideran parte de la reacción zonal con las cuales se previene la poliespermia (ovocitos fecundados por más de un espermatozoide). La unión primaria se distingue de la adhesión inespecífica cuando los espermatozoides permanecen adheridos a la ZP después de pipetearlos en forma moderada (Bleil, 1991). Tanto la región proteica como los carbohidratos de la ZP3 están involucrados en la inducción de la RA (Rossiere y Wassarman, 1992). Litscher et al. (1996), definen con mayor precisión la región funcional de la ZP3 como una región de 21 kDa de la porción C-terminal en la que se conservan los residuos O-glicosidados. Los residuos N-glicosidados, así como los residuos de ácido siálico se pueden eliminar por digestión enzimática sin pérdida de potencia. Las evidencias que señalan a la ZP3 como la responsable de la unión primaria con el espermatozoide y la inductora de la RA son las siguientes:

- De las tres glicoproteínas que conforman la ZP, sólo los fragmentos de 1.6 a 6 kDa de ZP3 proteolizada con pronasa (a concentraciones 10-100 nM) inhiben la unión primaria si los espermatozoides se preincuban en su presencia antes de exponerlos a la ZP intacta. Por el contrario, los fragmentos de la ZP3 de ovocitos fecundados (ZP3f) no inhiben la unión primaria (Bleil y Wassarman, 1983).
- La ZP3 purificada induce por sí sola la RA.
- La ZP3 recombinante induce la RA con la misma eficiencia que la natural (Beebe et al., 1992, Brewis et al., 1996) y también inhibe la unión primaria.

Además de la ZP3, se conocen otras moléculas que inducen la RA. Entre estas tenemos a la progesterona (Thomas y Meizel., 1989; Blackmore et al., 1990; Baldi et al., 1991; Meizel et al., 1997); el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Wistrom y Meizel., 1993; Roldán et al., 1994; Shi et al., 1997), la glicina (Meléndrez y Meizel., 1995) y el factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Lax et al., 1994). La progesterona y el GABA se han utilizado en ratón y en humano, la glicina en cerdo y el FCE en bovino. Si bien se desconoce la relevancia fisiológica de estos inductores, se sabe que el GABA y la progesterona pueden estar presentes a concentraciones efectivas en la zona de fecundación (Meizel., 1997; Baldi et al., 1998).

Receptores a la ZP3. Actualmente, la identidad del (los) receptor (es) a la ZP3 está en debate. Varias proteínas del espermatozoide (algunas de ellas con actividad enzimática) tienen características esperadas para el receptor a la ZP3: se localizan en la membrana plasmática sobre la región acrosomal, se asocian específicamente a la ZP3 o a su porción O-glicosilada, se pierden durante la RA y, la unión primaria y la RA se inhiben por anticuerpos generados contra ellas así como por sustratos o inhibidores específicos de las actividades enzimáticas determinadas para estos receptores (López et al., 1995; Leyton y Saling; 1989; Bleil, 1991; Moller et al., 1992; Ward y Kopf, 1993; Gong et al., 1995). Entre los diferentes receptores propuestos está uno con actividad de galactosiltransferasa (R-Galtasa), otro con actividad de tirosin cinasa de 95 kDa (ZRK), un tercero con peso molecular de 56 kDa (sp56), otro con actividad de serin proteasa (SP) y por último receptores de origen extraespermático (presentes en fluido de retetestis y en plasma seminal) conocidas genéricamente como adhesinas espermáticas (AS) (Storey, 1995; McLesky, 1998). De estos, tanto las AS como el sp56 carecen de dominios transmembranales. Están adheridos a la superficie espermática lo que posiblemente indique que participan en la unión primaria sin activar las cascadas de transducción que disparan la RA. No todos los receptores están presentes en todas las especies, sugiriendo especificidad de especie. Por ejemplo, el R-Galtasa es más abundante en roedores que en otras especies (Larson y Miller., 1997) y el sp56 se ha localizado en ratón y en hamster pero no en humano ni en cuyo (Bookbinder et al., 1995).

Transducción de señales, flujos iónicos y su regulación durante la RA. Los flujos iónicos más estudiados durante la RA tanto de espermatozoides de especies marinas como en el espermatozoide de mamífero son el eflujo de H^+ y el influjo de Ca^{2+} (revisado en Darszon et al., 1998). En el erizo de mar también se tiene conocimiento del influjo de Na^+ y del eflujo de K^+ y,

en el espermatozoide de mamífero, se tienen evidencias de influjo de Na^+ y del eflujo de Cl^- . Además, gracias a estudios multidisciplinarios (bioquímicos, farmacológicos y electrofisiológicos), se tiene una visión cada vez más clara de la identidad de los transportadores iónicos que participan en la RA y como es que son regulados. En la tabla 1 se resumen las evidencias de los flujos iónicos que se presentan durante la RA. A continuación se describen los mecanismos iniciales de activación de la respuesta a la ZP3 y después se describen los reportes que sugieren como se pueden estar regulando los flujos (y canales) iónicos en pasos sucesivos. Al final se describen también los flujos iónicos disparados por otros inductores de la RA como la progesterona y el GABA y su regulación.

Un factor común encontrado para varios de los receptores a la ZP3 es que la RA se puede inducir con anticuerpos aglutinantes (o con regiones Fab + IgG) dirigidos contra cualquiera de ellos (Kopf et al., 1989; Leyton y Saling, 1989; Boettger-Tong et al., 1992; Aarons et al., 1992, Gong et al., 1995). Esto sugiere que es importante la agregación de receptores para su activación en las etapas iniciales de la RA. ¿Como es que la activación del (de los) receptor (es) de la ZP3 transduce (n) la señal? Existen tres mecanismos por los que parece iniciarse la transducción de señales durante la RA a partir de receptores membranales activados: vía proteínas G, por fosforilación vía receptores tipo cinasas de tirosinas y por cambios en el potencial de membrana debidos a la apertura de canales iónicos.

Las proteínas G son complejos heterotriméricos compuestos por subunidades α , β , y γ , que se localizan en la superficie citoplasmática de la membrana asociadas al receptor. Al formarse el complejo ligando-receptor, se favorece la unión de GTP a la subunidad α , la disociación del heterotrimerio y la activación de la proteína G (Gether y Kobilka, 1998). La primera evidencia indirecta que sugiere la participación de proteínas G durante la RA fue obtenida por Florman y Storey (1982). Estos autores utilizaron 3-quinuclidinil benzilato (QNB) para inhibir la reacción acrosomal. El QNB es un inhibidor de receptores muscarínicos los cuales modulan proteínas G del tipo G_s , y G_i (Roux et al., 1998). En el espermatozoide de mamífero se han identificado proteínas G del tipo G_i , G_q y G_z , (Kopf et al., 1986; Glassner et al., 1991; Walensky y Snyder., 1995). La ZP3 estimula la actividad de G_{i1} y G_{i2} selectivamente tanto en espermatozoides completos como en membrana plasmática purificada (Ward et al., 1992; 1994). Dicho efecto es sensible a la toxina Pertusis (PTX; inhibidor específico de G_i). Esto era de esperarse ya que

Tabla 1. Evidencias de flujos iónicos durante la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero.

ION	INDUCCIÓN	OBSERVACIONES	SISTEMAS DE TRANSPORTE	ESPECIES
Ca^{2+}	A-23187 ZP progesterona	Inhibición de la RA por: DHPs, verapamil o cationes divalentes. Inducción de RA con tapsigargina. Canal de Ca^{2+} modulado por pHi	Canales de Ca^{2+} (¿tipo L o T?) Receptor de IP3 ¿Capacitativo*?	bovino ⁵ , carnero ^{2,5} , humano ^{4,7} , ratón ^{13,14,15,16} .
H^+	A-231287 pH 7.5-8.2 + Ca^{2+} (> 2mM)	Incremento de Ca^{2+} sensible a PTX (proteína G). Flujos de Ca^{2+} regulado por pHi.	¿Intercambiador Na^+ - Cl^- - HCO_3^- , canal protónico?	hamster ¹ , carnero ² , bovino ⁵ , ratón ^{8,9} .
Cl^-	progesterona GABA Glicina	Subunidad α del R-GABA _A localizada x inmunocito. Inhibición de la RA por picrotoxina o estricnina.	R-GABA _A R-Glicina.	humano ¹ , ratón ¹⁰ , cerdo ¹¹ .
Na^+	ZP progesterona	Depolarización en Na^+ > 125 mM.	Canal Catiónico (pobre selectividad)	humano ¹² , ratón ⁹ .

* Capacitativo = canal de Ca^{2+} operado por liberación de Ca^{2+} de pozas internas.

Referencias:

- 1) Murphy y Yanaguimachi, 1984. 2) Babcock y Pfiffer, 1987. 3) Florman et al., 1989. 4) Blackmore et al., 1991. 5) Florman et al., 1992.
6) Wistrom y Meizel, 1993. 7) Yang et al., 1994. 8) Zeng et al., 1996. 9) Arnoult et al., 1996a. 10) Roldán et al., 1994.
11) Melendrez y Meizel, 1996. 12) Foresta et al., 1993,1995. 13) Liévano et al., 1996. 14) Treviño et al., 1998. 15) Santi et al., 1998.
16) Harvey Florman (comunicación personal).

anteriormente se había demostrado que PTX inhibe también la RA y los flujos iónicos (de H^+ y de Ca^{2+}) asociados a ella (Endo et al., 1987; Florman et al., 1989; Lee et al., 1992). Mediante mediciones fluorométricas del pH_i y de la $[Ca^{2+}]_i$ en célula única, Arnoult et al. (1996a), demostraron que la alcalinización citoplásmica es el paso sensible a la PTX. Se han caracterizado flujos de Ca^{2+} sensibles al pH tanto en espermatozoides de erizo de mar (revisado en Darszon et al., 1998) como en células espermatogénicas y espermatozoides testiculares de ratón (Santi et al., 1998). Estos datos sugieren que el incremento de pH_i antecede y activa (directa o indirectamente) al menos parte del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que a su vez explicaría por qué PTX inhibe ambos flujos. No se sabe con certeza cuál de los receptores mencionados anteriormente activa a Gi ni cuál es su blanco. Es interesante destacar que la agregación del R-Galtasa modula a Gi a la cual está asociado directamente (Gong et al., 1995), y que la sobreexpresión del R-Galtasa hace hipersensibles a los espermatozoides a la inducción de la RA con ZP3 (Youakim et al., 1994). La subunidad α_i de la proteína Gi modula la actividad de la AC, de la PLC y de canales iónicos en otros sistemas (Wikman y Clapham, 1995). La AC del espermatozoide del erizo de mar es insensible a proteínas G (Hildebrandt et al., 1985; Garbers et al., 1989) pero en el espermatozoide de mamífero se desconoce si modulan a la AC o a canales iónicos. En el ratón, la generación de DAG durante la RA inducida por ZPs solubilizadas, es sensible a inhibición por PTX (Murase y Roldán, 1996). Esto sugiere que Gi modula directamente a una PLC γ o que la activación de PLC γ puede deberse al incremento de Ca^{2+} asociado al incremento de pH_i , que sería el evento regulado por Gi (Murase y Roldán, 1996).

Otro mecanismo por el cual se cree que se inicia la transducción de señales durante la RA es mediante la activación de ZRK (una tirosin cinasa y uno de los receptores putativos a la ZP3) (Layton y Saling 1989b; Burks et al., 1995; Murase y Roldán 1996). Se sabe que los receptores tipo tirosin cinasa unidos a sus ligandos se agregan y autofosforilan para formar dímeros funcionales que posteriormente fosforilan y regulan a otras proteínas (Heldin, 1996). ZRK se dimeriza y autofosforila bajo efecto de la ZP3 (Leyton et al., 1995). Aunque recientemente se ha puesto en duda la existencia de la ZRK suscitando un acalorado debate sobre si es una tirosin cinasa (Burks et al., 1995; Naz et al., 1996; McLesky et al., 1998) o si es una hexokinasa (Kalab et al., 1994; Visconti et al., 1996; Travis et al., 1998), hay evidencias de que otros receptores tipo tirosin cinasa pueden estar interviniendo en la RA del mamífero. Por ejemplo, en bovinos la

activación del receptor al FCE, dispara la RA (Lax et al., 1994). Tanto la RA inducida con la ZP como la inducida con FCE, son sensibles a inhibidores de cinasas de tirosina (lavendustina y tirfostina A). La RA inducida con FCE es sensible también a inhibidores de PKC, sugiriendo que esta molécula participa en la cascada que se activa con dicho receptor. Se sospecha que en la RA las cinasas de tirosina membranales pueden estar activando a PLC γ , el intercambio Na⁺/H⁺, a canales de Ca²⁺ y a cinasas de tirosina solubles (revisado en Breitbart y Spungin, 1996).

El potencial de membrana es un tercer mecanismo por el que se inicia la transducción de señales durante la RA. La regulación de los flujos iónicos durante la RA es multifactorial y se ha demostrado que varios de ellos están asociados a cambios en el potencial de membrana. Los espermatozoides capacitados tienen un potencial de reposo de alrededor de -60 mV (Zeng et al., 1995) y la ZP solubilizada así como la ZP3, activan una depolarización en el espermatozoide de ratón y de toro (Arnoult et al., 1996a). La vía de permeabilidad responsable de la depolarización es poco selectiva y se piensa que se debe a la apertura de un canal catiónico que, bajo las condiciones iónicas presentes durante la inducción de la RA, dejaría pasar Na⁺. Se tienen varias evidencias electrofisiológicas de la presencia de canales catiónicos en el espermatozoide. Labarca et al. (1995), determinaron la presencia, en el espermatozoide de ratón, de canales permeables a cationes monovalentes con baja selectividad ($P_{Na^+}/P_{K^+} = 2.5$). Estos estudios se hicieron reconstituyendo canales iónicos en bicapas lipídicas a partir de vesículas de membrana plasmática. Recientemente, se clonó el cDNA que codifica un canal de K⁺ poco selectivo de células espermátogénicas de ratón (Schreiber et al., 1998). Este canal presenta una permeabilidad relativa P_{K^+}/P_{Na^+} de 5 por lo que su potencial de inversión es cercano a -30 mV. No se sabe si el canal de K⁺ que fue clonado de las células espermátogénicas es el mismo que el observado al reconstituir canales iónicos en bicapas a partir de membrana espermática. Sin embargo, es claro que la activación de un canal con estas características durante la RA depolarizaría a la célula. Además de estos canales catiónicos poco selectivos, se tienen evidencias electrofisiológicas y farmacológicas de la presencia de canales de K⁺ y de Ca²⁺ activados por voltaje en el espermatozoide (Babcock y Pfeiffer, 1987; Cox et al., 1991; Beltrán et al., 1994; Tiwari-Woodruff et al., 1995; Labarca et al., 1995; Chen et al., 1997) y en células espermátogénicas (Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996). El canal de K⁺ es sensible al TEA⁺ y la depolarización inducida por alto K⁺ (y a pH alcalino), abre CCDV sensibles a las dihidropiridinas.

(Florman et al., 1992). Tiwari-Woodroff et al., (1995), registraron un canal de Ca^{2+} de 10 pS reconstituido en bicapas planas a partir de membrana plasmática de espermatozoide de cerdo. Otra evidencia (aunque indirecta) de la presencia de estos canales proviene de estudios en células espermatogénicas. Además de CCDV sensibles a dihidropiridinas, la membrana plasmática del espermatozoide de ratón presenta también canales de Ca^{2+} de alta conductancia sensibles al Ni^{2+} y al Co^{2+} (Beltrán et al., 1994) y que probablemente también sea permeable al Mn^{2+} (Florman 1994). El erizo de mar presenta tanto canales sensibles a DHPs y a cationes divalentes con características similares a las descritas para el espermatozoide de mamífero (revisado en Darszon et al., 1998).

Previamente, en experimentos de medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por medios fluorescentes, Guerrero y Darszon (1989), determinaron la relación temporal de la apertura de estos 2 tipos de canales de Ca^{2+} en el espermatozoide del erizo de mar. Concluyeron que durante la RA en esa especie, primero se abre el canal sensible a dihidropiridinas y posteriormente el canal sensible a bloqueo por cationes divalentes y permeable a Mn^{2+} . Además, el segundo canal requiere para su apertura, que se halla abierto el primero y de la alcalinización del pH_i. Un mecanismo similar puede estar operando en el espermatozoide de mamífero (Florman, 1994). Recientemente se reportó la presencia de un canal de Ca^{2+} regulado por pH_i en células espermatogénicas de ratón que comparte características con canales de Ca^{2+} capacitativos (Santi et al., 1998). Se especula sobre la posible participación de dicho canal durante la RA en la cual estaría regulado tanto por los incrementos en Ca^{2+} intracelular como en pH_i, permitiendo un aumento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Durante la RA se elevan los niveles de AMPc y el metabolismo de los fosfolípidos. En ambos casos se activan cinasas desencadenándose la fosforilación de varias proteínas (Thomas y Meizel., 1989; Kopf y Gerton, 1990, Roldán et al., 1994; O'toole et al., 1996b). Los inhibidores conocidos para cualquiera de las cinasas inhiben parcialmente la RA, pero su efecto es más potente cuando se utilizan combinados (Baldi et al., 1996). En el toro, los cambios en Ca^{2+} intracelular son sensibles a inhibidores de PKC en el espermatozoide completo (Lax et al., 1994), y PKA o PKC modulan los flujos de Ca^{2+} en vesículas de membrana plasmática o en acrosomas purificados (Spungin y Breitbart, 1995). Esto indica que al menos parte del efecto de los inhibidores se debe a que afectan el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En su proceso de activación, PKC pasa de una localización citoplásmica a una adyacente a la membrana plasmática, anclándose al diacilglicerol. La RA inducida con ZP o con activadores de PKC (ésteres de forbol, diacilglicerol)

provocan la translocación de PKC a la membrana plasmática (Lee et al., 1987; Endo et al., 1991) de manera dependiente de Ca^{2+} (Lax et al., 1997), sugiriendo una retroalimentación positiva y sinérgica entre PKC y el Ca^{2+} intracelular. Algunos autores han reportado que el uso de activadores tanto de PKC como de otras cinasas, inducen la RA en ausencia de Ca^{2+} externo, especialmente cuando se combinan (Rotem et al., 1992; Mendoza et al., 1995; Doherty et al., 1995). Esto era inesperado ya que clásicamente se había considerado al Ca^{2+} externo como indispensable para la RA. Una posible explicación es que los influjos de Ca^{2+} sean importantes en la modulación de cinasas en etapas iniciales e intermedias de la RA inducida con la ZP3, pero no en las etapas más avanzadas. De esta manera, la inducción artificial de la RA con activadores de cinasas eliminarían los requerimientos iniciales de Ca^{2+} extracelular. Estos datos también sugieren que el Ca^{2+} no participa en los eventos finales de la RA, o, más probablemente, que el Ca^{2+} necesario hacia el final de la RA es suministrado por pozas internas.

Se considera que el Ca^{2+} es importante para la fusión de membranas y por tanto, en los eventos excitóticos como la RA. Actualmente se tienen varias evidencias del posible papel del acrosoma como poza interna de Ca^{2+} y de su participación en la liberación del divalente durante la RA. La tapsigargina, inhibidor de ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplasmático (Thastrup et al., 1990), eleva los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y dispara la RA en el espermatozoide de humano y de ratón (Meizel y Turner, 1993; Walensky y Snyder, 1995). Es interesante destacar que la respuesta a la tapsigargina es dependiente del Ca^{2+} externo, lo que sugiere que ambas vías están intercomunicadas. El R-IP3 ha sido inmunolocalizado en la membrana del acrosoma y se piensa que el Ca^{2+} podría ser liberado vía el R-IP3 de este organelo (Walensky y Snyder, 1995). Además, la tapsigargina y el IP3 (pero no la cafeína), inhiben la acumulación de Ca^{2+} tanto en espermatozoides permeabilizados (Walensky y Snyder, 1995), como en acrosomas aislados (Breitbart y Spungin, 1996). La liberación de Ca^{2+} por IP3 se inhibe por H89, inhibidor de PKA, sugiriendo que el R-IP3 es regulado por dicha cinasa. Se sabe que el receptor a IP3 es sensible al pH_i y que la liberación de Ca^{2+} por este receptor es favorecida a pH alcalino (Berridge, 1993). En un sistema subcelular, consistente en vesículas de membrana plasmática y acrosomas purificados, se determinó que, tanto la modulación de filamentos de actina como la fusión de membranas, requieren de pH_i alcalino y altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Spungin et al., 1995; Spungin y Breitbart, 1995). Estos resultados, junto con los obtenidos con los activadores de

cinastas, sugieren que el Ca^{2+} puede ser liberado de pozas internas participando en la fusión de membranas durante la RA.

En resumen, durante la RA inducida con ZP3 se activan 3 vías de transducción de señales que influyen sobre flujos iónicos: proteínas Gi, el ZRK y cambios en el potencial de membrana. Las proteínas Gi activan un eflujo de H^+ . La alcalinización resultante puede modular a canales iónicos de Ca^{2+} (incluido el R-IP3) o canales catiónicos monovalentes de baja selectividad. El ZRK activa a cinastas de CTSs y a PKA (vía incrementos de AMPc). El canal de IP3 se modula positivamente por PKA y el canal de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas se modula negativamente por CTSs. Tal vez ZRK activa a PLC γ con la consecuente liberación de IP3 y DAG. IP3 activa a su receptor en el acrosoma y el DAG junto con Ca^{2+} activan a PKC. PKC fosforila a una vía permeable a Ca^{2+} en membrana plasmática. Por otro lado, la ZP3 induce una depolarización al abrir un canal catiónico poco selectivo. Esta depolarización podría activar a canales de Ca^{2+} de dos tipos, uno selectivo y sensible a DHPs y a Ni^{2+} y el otro permeable a Mn^{2+} y sensible a Co^{2+} y Cd^{2+} . Puntualizando, los flujos iónicos en la RA parecen activarse por la ZP3 y por depolarización, además de ser modulados por pH alcalino y por fosforilación (figura 4).

RA inducida por progesterona o por GABA. Anteriormente mencionamos que además de la ZP3, otros compuestos pueden inducir la RA. En años recientes se han estudiado ampliamente los mecanismos de inducción de la RA por la progesterona y por el GABA. Turner y Meizel (1989) observaron que un factor presente en el líquido folicular induce la RA y los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados a ella. Posteriormente se demostró que dicho factor es la progesterona (Blackmore et al., 1990). En analogía con la RA inducida por la ZP3, la progesterona induce una depolarización e incrementos en pH $_i$ y en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son bifásicos y presentan una fase rápida de aumento y una fase de meseta la cual es sensible a inhibidores de cinastas de tirosina (Bonaccorsi et al., 1995). Existen evidencias a favor (O'toole et al., 1996a, b) y en contra (Foresta y Rossato, 1997) de que al menos parte del incremento de Ca^{2+} intracelular se debe a la apertura de canales sensibles a DHPs. La progesterona induce una depolarización que podría estar activando CCDVs. Se proponen dos vías de permeabilidad para la depolarización. Una de ellas presenta características de un canal catiónico poco selectivo a través del cual permea el Na^+ (Foresta et al., 1993, 1995). Se sugiere

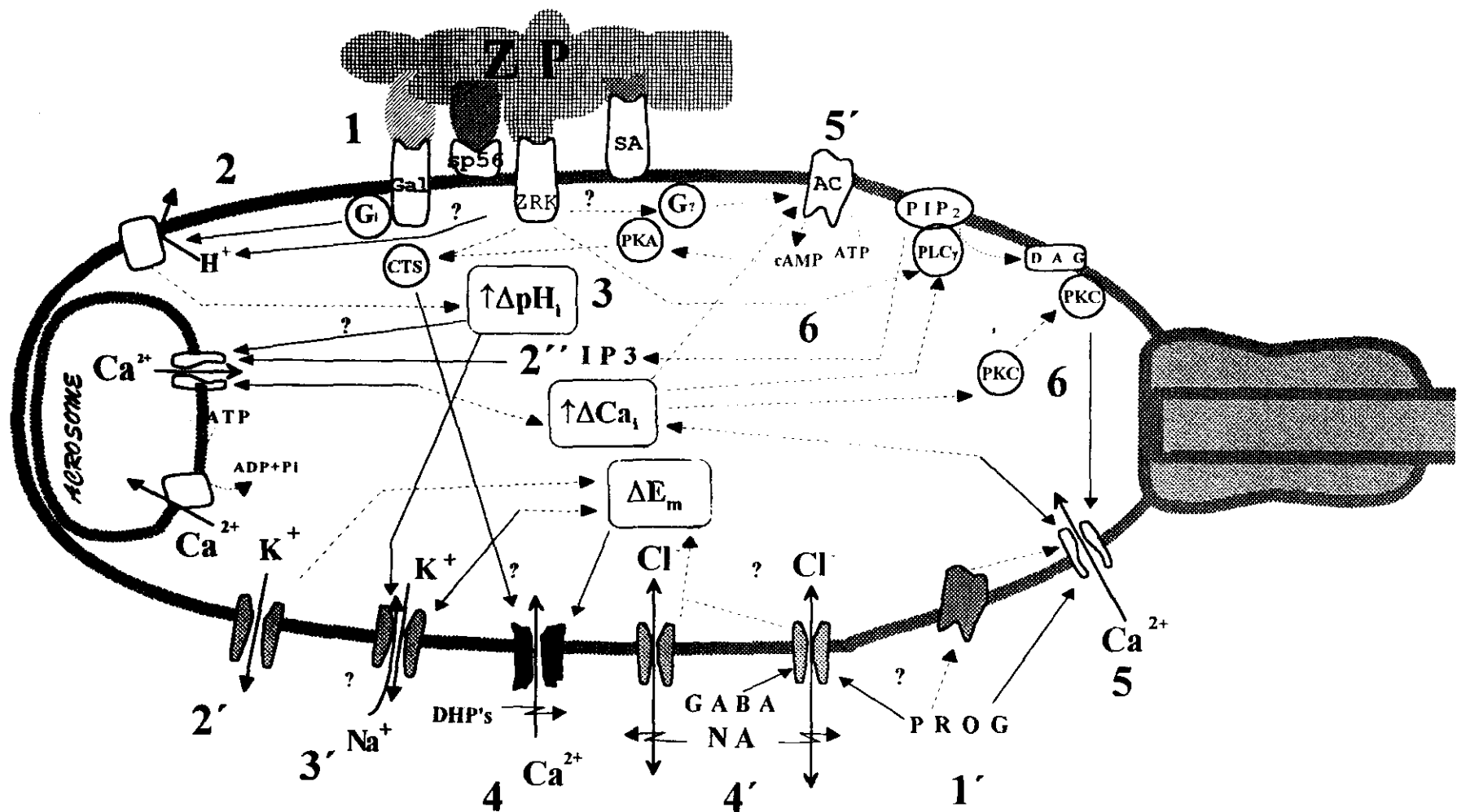


Figura 4. Transducción de señales durante la RA. La figura destaca los posibles receptores tanto a la ZP3 (1) como al GABA y la progesterona (1'), la modulación de un transportador de H^+ (con el consecuente cambio en pH_i) vía proteínas G_i sensibles a PTX (2,3), así como la modulación de canales iónicos tanto de membrana plasmática como de acrosoma por pH_i (2'',3'), por potencial de membrana (3',4), por ligando (4',5) y por segundos mensajeros o fosforilación (4,5,6) (Tomado de Darszon et al., 1998). Las flechas de línea sólida indican la dirección de los flujos iónicos o los mecanismos propuestos de regulación directa de los canales iónicos.

también que la depolarización puede deberse al eflujo de Cl⁻ vía el R-GABA_A (Turner y Meizel., 1995; Sabeur et al., 1996). ¿Cómo es que la progesterona activa a este receptor? Se sabe que la actividad del R-GABA_A neuronal es potenciada por metabolitos de la progesterona y que tiene sitios de unión a este ligando (Majewska, 1990; Wehling 1997). La RA inducida con progesterona se inhibe con antagonistas del R-GABA_A. Esto sugiere que, a diferencia del R-GABA_A neuronal, el receptor en el espermatozoide puede ser activado por la progesterona aún en ausencia del GABA mismo. Además de los eflujos predecibles de Cl⁻, el GABA también induce incrementos en la [Ca²⁺]_i y pH y por supuesto la RA. El R-GABA_A neuronal tiene varios sitios consenso para fosforilación (McDonald y Olsen, 1994). Durante la RA inducida por progesterona se fosforilan proteínas (Tesarik et al., 1993b), posiblemente una de ellas corresponda a la subunidad α de 50 kDa del R-GABA_A localizada hacia la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Wistrom y Meizel, 1993). Por otro lado, existen diferencias durante la RA inducida con ZP y con progesterona o con GABA. Entre las principales diferencias está que los incrementos del pH_i, de la [Ca²⁺]_i y de DAG provocados por progesterona y GABA son insensibles a la inhibición por PTX (Tesarik et al., 1993; Murase y Roldán 1996). Esto indica que, al menos parte de los mecanismos de inducción son diferentes (figura 4).

I.3 Transporte Iónico.

El transporte a través de las membranas biológicas tiene implicaciones muy importantes para la vida y participa en un sin número de eventos desde los clásicamente estudiados en la electrofisiología (potencial de acción) así como en transporte facilitado de diferentes metabolitos (glucosa, aminoácidos), en regulación osmótica y volumen celular, etc. En relación a los transportadores iónicos de membrana, estos son necesarios ya que la región lipídica de las membranas conforma una barrera energética muy alta al flujo de iones (Latorre y Álvarez, 1996). La resistencia al flujo iónico en una bicapa lipídica sintética está alrededor de 10⁸ ohms cm² (10⁵⁻⁸ veces mayor que la resistencia en las membranas biológicas). Como resultado de esto la capacidad del flujo de iones a través de esta región hidrofóbica es tan pequeña que, de no estar presentes los transportadores iónicos, sería imposible tanto el establecimiento del potencial de reposo de las células, como llevar a cabo eventos como la conducción eléctrica neuronal, la contracción muscular y, como se mencionó anteriormente, la RA. Existen diferentes tipos de transportadores

iónicos que se pueden clasificar en cuanto a la selectividad, el número de recambio y los requerimientos energéticos. En los extremos tenemos, por un lado, a aquellos que transportan iones en contra de un gradiente electroquímico con gasto de energía, de poca capacidad (10^2 iones/s) y que además son sumamente selectivos (ATPasas), y, por otro lado, a los canales iónicos, que son menos selectivos, de gran capacidad de transporte (10^{6-8} iones/s) y que conducen los iones pasivamente (sin gasto energético) de acuerdo a su gradiente electroquímico (Miller, 1986). En esta sección se da un esbozo general de qué son, cómo se regulan y que características funcionales se estudian de los canales iónicos, enfatizando en características de canales de Ca^{2+} tipo-T y en el R-GABA_A que, como se mencionó anteriormente, posiblemente intervienen en la RA.

1.3.1 Los canales iónicos.

La biología molecular de los canales iónicos y la modelación teórica basada en estudios ultraestructurales de microscopía electrónica y, muy recientemente, estudios de difracción de rayos-X de la primera cristalización exitosa de un canal iónico, han permitido confirmar una serie de predicciones de la estructura de estas moléculas hechas previamente con base en estudios electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos (Hille, 1992; Unwin, 1993,1995; Aidley y Stanfield, 1996; Doyle et al., 1998). Los canales iónicos, al igual que otros transportadores, son proteínas integrales de membrana. Una característica distintiva (aunque al parecer no exclusiva (Kuprinski et al., 1989; Schultz et al., 1992)) del canal iónico es que forma un poro acuoso por el cual los iones pueden difundir de uno a otro lado de las membranas celulares. Con frecuencia se menciona que este poro es hidrofílico (Miller, 1986), cuando en realidad parece ser que al menos parte de la región del poro es hidrofóbica (Doyle, 1998). De hecho, la mayor parte de la secuencia de la región P (poro putativo en canales dependientes de voltaje) corresponde a aminoácidos hidrofóbicos (Guy y Seetharamulu, 1986, Stühmer y Latorre, 1996). Las predicciones basadas en la secuencia primaria indican que varias de las regiones de los canales iónicos son esencialmente regiones hidrofóbicas (~ 20 aminoácidos) de una longitud tal que permitirían su incrustación en la membrana atravesándola por completo. Esto se ha podido confirmar con péptidos sintéticos de 23 aminoácidos, homólogos a la región M2 del receptor nicotínico de acetilcolina (R-nAch), que al oligomerizarse forman poros con características esperadas para el canal nativo (Montal et al.,

1990, Oblatt-Montal et al., 1993). Las predicciones de estructura secundaria de estas regiones hidrofóbicas muestran una clara tendencia a formar α -hélices. Se piensa que además de las α -hélices, la parte transmembranal de la proteína puede estar constituida por estructuras β -plegadas también hidrofóbicas, al menos en el R-nAch (Unwin, 1993). La secuencia primaria sugiere también la presencia de zonas hidrofílicas que muy probablemente estén localizadas hacia el lado citoplásmico o hacia el lado extracitoplásmico de la membrana, semisuspendidas en soluciones acuosas. En las figuras 5, 6 y 7, se muestran modelos de canales iónicos. Además de las estructuras arriba mencionadas, en estas figuras se destacan también la presencia de un filtro de selectividad, región sensora del voltaje, compuertas de apertura-cierre y de inactivación, regiones extramembranales y, finalmente que los canales iónicos están constituidos por oligómeros (hetero u homooligómeros) y, proteínas asociadas que participan en la regulación del canal.

Funcionalmente hablando, los canales iónicos se distinguen unos de otros por diferencias en su selectividad iónica, permeabilidad, conductancia, cinética y regulación. La clasificación de los canales iónicos de acuerdo a su selectividad, considera cual es el principal ión que, en condiciones fisiológicas, permea el canal. De esta manera los canales se conocen como canales de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ o Cl^- y, cuando son pobremente selectivos, se les nombra como canales catiónicos o aniónicos. El filtro de selectividad es generalmente la porción más angosta del canal y que por tamaño y fuerzas electrostáticas seleccionan al ión a permear (figura 5).

En términos generales los canales pueden activarse por compuestos químicos o por factores físicos. Los canales también pueden clasificarse de acuerdo a la manera como se activan en: canales activados por ligando, canales activados por nucleótidos cíclicos, canales activados por voltaje, y canales activados por estrés mecánico u osmótico. Los estudios farmacológicos de la RA y de inmunocitoquímica del espermatozoide sitúan a canales de Cl^- activados por ligando (R-GABA_A) y a canales de Ca^{2+} activados por voltaje (posiblemente canales de Ca^{2+} tipo T), como candidatos importantes a participar en los flujos iónicos que se desencadenan durante la RA. Es muy poco lo que se sabe de estos canales en el espermatozoide por lo que a continuación se da una descripción de canales homólogos a estos caracterizados en otros sistemas celulares.

I.3.2 Receptor de GABA tipo A (R-GABA_A).

Actualmente, los R-GABA se clasifican en tres grupos: El R-GABA_A, El R-GABA_B y el R-GABA_C (Macdonald y Olsen, 1994; Matt y Lewis, 1994; Djamgoz, 1995; Rabow et al., 1995). El R-GABA_A y el R-GABA_B están ampliamente distribuidos en las sinapsis del SNC, siendo más abundante el R-GABA_A (~ 70%). El R-GABA_C se localiza preferencialmente en retina. El R-GABA_A y el R-GABA_C (receptores ionotrópicos) son canales de Cl⁻ que junto con el R-glicina, el R-glutamato y el R-nAch, pertenecen a la familia de canales iónicos activados por ligando. Estos receptores responden rápidamente al estímulo inducido por el GABA abriendo una permeabilidad al Cl⁻. El R-GABA_B es un receptor metabotrópico con 7 segmentos transmembranales y acoplado a proteínas G que a su vez activan a canales de K⁺ o a canales de Ca²⁺, o a ambos. La respuesta al agonista en los receptores metabotrópicos es más lenta, variada y duradera. Además de la activación de canales, las proteínas G estimuladas por el receptor metabotrópico pueden desencadenar cascadas de fosforilación y la expresión genética de diversas proteínas. El agonista fisiológico de los R-GABA es un aminoácido apolar, el ácido γ -aminobutírico (GABA). La enzima responsable de la síntesis de GABA es la glutamato descarboxilasa (GAD). GAD cataliza la reacción de descarboxilación del carboxilo α del ácido glutámico, dando como resultado la producción de GABA y CO₂. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) (Dunn et al., 1994; Macdonald y

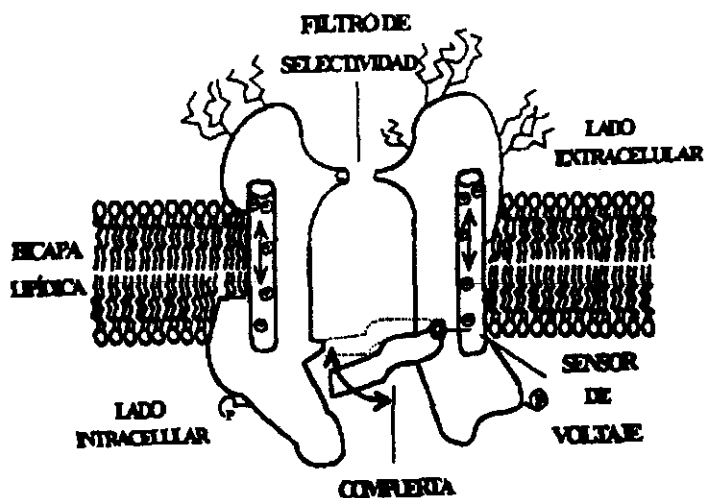


Figura 5. Esquema de un canal iónico. La figura muestra la topografía de un canal iónico en la membrana, las compuertas de activación e inactivación y el poro y filtro de selectividad.

Olsen, 1994, Djamgoz, 1995; Rabow et al., 1995). Prácticamente todas las neuronas son sensibles al GABA. En general los flujos iónicos inducidos por GABA resultan en una hiperpolarización de la membrana plasmática y por consecuencia en inhibición neuronal. En contraste con la neuronas del adulto, las neuronas del embrión responden con una depolarización debido a que el potencial de equilibrio para el Cl⁻ es más positivo que su potencial de reposo (Matt y Lewis., 1994; Obrietan y van de Pol, 1995, 1996). En el SNC la disminución en la respuesta al GABA puede desencadenar estados de hiperexcitabilidad que culminan en convulsiones como la epilepsia. Los fármacos que aumentan la actividad de este tipo de receptores se utilizan como anticonvulsivos, ansiolíticos, somníferos o como relajantes musculares. La sensibilidad a los fármacos es diferente entre los tres Rs-GABA. El R-GABA_A se activa con muscimol e inhibe con bicuculina y picrotoxina. El R-GABA_B es poco sensible al muscimol, insensible a los inhibidores del R-GABA_A y se activa con baclofenol. Finalmente el R-GABA_C también se bloquea con picrotoxina como el R-GABA_A, pero es insensible a la bicuculina y al baclofenol (Djamgoz , 1995).

Características de las corrientes iónicas a través del R-GABA_A, su modulación y regulación. Las corrientes unitarias a través del R-GABA_A varían según las células en las que se estudian y las subunidades de las que está compuesto (ver abajo). En términos generales podemos decir que presentan varios subniveles de conductancia con promedios cercanos a 10, 19, 33 y 44 pS. Su selectividad iónica es $SCN > I > Br > Cl >>> F^-$ (Boorman et al., 1987, Macdonald y Olsen, 1994; Rabow *et al.*, 1995). Hay una amplia variedad de compuestos que actúan como agonistas o antagonistas del R-GABA_A. Entre los agonistas naturales tenemos al GABA y a un agente alucinógeno el muscimol que estructuralmente es análogo al GABA y se obtiene del hongo *Amanita muscaria*. Entre los agonistas sintéticos está la isoguvicina. En la mayoría de las ocasiones las corrientes inducidas por GABA, en un tipo celular en particular, presentan un coeficiente de Hill superior a 1.8, indicando que probablemente se requieran de 2 moléculas de GABA para abrir al receptor, aunque hay casos en los que un solo GABA parece ser suficiente para activarlo (Rabow et al., 1995). Además de abrir el canal, el GABA incrementa el tiempo promedio abierto en forma dependiente de la concentración. Otros fármacos modulan el efecto de GABA, entre ellos están las benzodiazepinas, los barbitúricos y los esteroides. Según la isoforma, la modulación puede ser positiva o negativa. La aplicación de GABA en presencia de algunas

isoformas específicas de estos compuestos induce corrientes mayores a la observada cuando el GABA se aplica solo, es decir, potencian el efecto del GABA (Macdonald y Olsen, 1994; Rabow *et al.*, 1995). En términos generales las benzodiazepinas aumentan la probabilidad de apertura del canal sin afectar la conductancia unitaria, el tiempo promedio abierto o la respuesta máxima. En contraste, los barbitúricos aumentan el tiempo promedio abierto y la respuesta máxima sin modificar la conductancia o la frecuencia de las aperturas. Además, los barbitúricos por sí solos pueden activar al canal en ausencia de GABA. Algo análogo puede estar sucediendo en el espermatozoide durante la RA inducida con progesterona (Wistrom y Meizel, 1993). Entre los antagonistas del R-GABA_A están la picrotoxina (un agente que se une al sitio del poro ocluyendo al canal) y la bicuculina (agente que se cree actúa como inhibidor competitivo). Ambos compuestos inhiben la RA en mamíferos (Wistrom y Meizel, 1993; Shi y Roldán, 1995). También existen evidencias de que el ácido niflúmico (AN) actúa como modulador del R-GABA_A (Woodward *et al.*, 1994) y que su sitio de unión puede estar en el poro (Evoniuk y Scolnik, 1988).

El R-GABA_A se regula por fosforilación con la intervención de segundos mensajeros entre los que posiblemente está el Ca²⁺ (Gyenes *et al.*, 1994; Leidenheimer y Chapell, 1997; Aguayo *et al.*, 1998). La cadena citoplásmica de unión entre los segmentos transmembranales S3 y S4 tiene sitios consenso de fosforilación tanto para PKA, como para PKC y PKT. La subunidad β parece ser el principal sustrato para PKA. La fosforilación por PKA en neuronas espinales reduce la probabilidad de apertura. En contraste, la estimulación de PKA por 8-Br AMPc incrementa las corrientes inducidas del R-GABA_A expresado a partir de las subunidades α1 β1 γ2 en células L929. PKC fosforila tanto a subunidades β1 como γ2 y moléculas activadoras de PKC (ésteres de forbol) inhiben corrientes del R-GABA_A tanto en rebanadas de cerebro como en ovocitos de *Xenopus* (revisado en Macdonald y Olsen, 1994).

Modelo estructural del R-GABA_A El R-GABA_A es un heteropentámero que está formado por cinco diferentes clases de subunidades, denominadas α, β, γ, δ y ρ y cada una de estas subunidades contribuye a la formación de la pared del canal o poro (Figura 6). Las subunidades α, β, γ y δ se han identificado en el cerebro y la ρ solamente en retina (Macdonald y Olsen, 1994). Cada una de las familias de subunidades tiene múltiples subtipos (6-α, 4-β, 4-γ, δ y 2-ρ). La combinación de estas cinco subunidades que parece ser la más ampliamente distribuida

en el cerebro de vertebrados son $\alpha 1 \alpha x \beta 2 \beta y \gamma 2$. Aunque también es posible que existan otras combinaciones tales como: $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$, $\alpha 2 \beta 3 \gamma x$, $\alpha 5 \beta 1 \gamma x$, $\alpha 1 \alpha 4 \beta 2 \delta$ y $\alpha 1 \alpha 6 \beta 2 \delta$, o que de la combinación que se haya más ampliamente distribuida en vertebrados, la subunidad $\gamma 2$ podría reemplazarse por la subunidad $\gamma 1$, $\gamma 3$, δ , $\rho 1$ o $\rho 2$. Existe además la posibilidad de que algunos receptores estén formados solamente de la subunidades α , β (Macdonald y Olsen, 1994; Rabow *et al*; 1995). Cada subunidad posee cuatro dominios transmembranales enumerados (M1-M4) y, como ya mencionamos, entre los dominios M3 y M4 hay un gran dominio intracelular que contiene un consenso de secuencias para la fosforilación de varias cinasas (Macdonald y Olsen, 1994). Se ha postulado que el segundo dominio transmembranal (M2) de cada una de las subunidades forma el canal (Figura 8). En el dominio dos, se localizan residuos de serinas y treoninas que podrían facilitar el movimiento de iones a través del canal, como se ha propuesto para el canal nicotínico de acetilcolina (Rabow *et al*; 1995). La contribución de varias subunidades en los sitios alostéricos no se entiende bien todavía, aunque se han establecido varias correlaciones funcionales. Por ejemplo, se sabe que el sitio de unión tanto para el GABA como para las benzodiazepinas está en las subunidades α y la modulación y la sensibilidad a las benzodiazepinas depende de la presencia de subunidades β y $\gamma 2$, respectivamente.

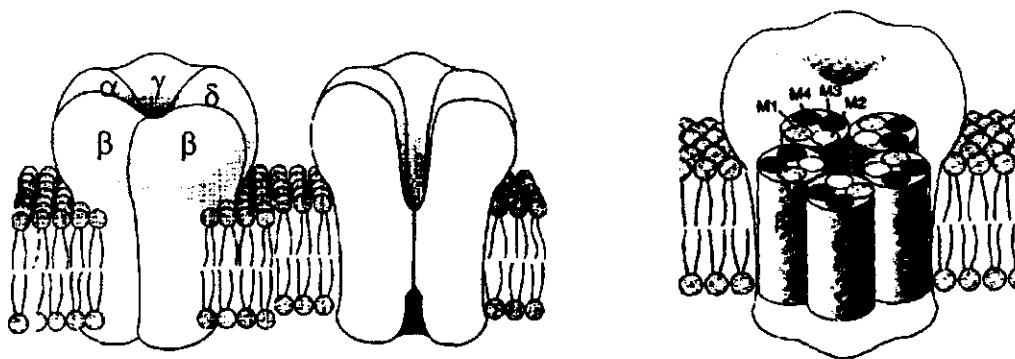


Figura 6. Modelo estructural del R-GABA_A. El R-GABA_A se forma con cinco subunidades que pueden ser del tipo α , β , δ , o γ (izquierda). El dominio transmembranal M2 es el formador del poro (derecha).

1.3.3 Canal de Ca²⁺ tipo T.

Los canales de Ca²⁺ tipo T pertenecen a una familia de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDV) (Aidley y Stanfield, 1996, Tabares y López-Barneo, 1996). Se sabe que más de un tipo de canal puede estar presente en la misma célula y que cada uno de ellos puede tener funciones relativamente específicas y diferenciables (Matteson et al., 1986; Narahashi et al., 1987; Liévano et al., 1994). Los estudios electrofisiológicos de corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje en varios tipos celulares, mostraron grupos de corrientes iónicas (tanto a nivel de canal unitario como a nivel de célula completa) que presentan diferencias en su dependencia al voltaje, características cinéticas, selectividad iónica, conductancia unitaria y sensibilidad a bloqueadores. Estas corrientes se clasificaron en corrientes L, P/Q, N, y R-T. En relación a la voltaje dependencia de activación, los CCDV se han clasificado en aquellos que se activan en un umbral bajo (voltajes relativamente hiperpolarizados -40 a -80 mV) y corresponden a las corrientes de tipo T y aquellos que se activan a voltajes más depolarizados (de alto umbral, > -20 mV) y que corresponden a los demás tipos de corrientes. Las células espermatogénicas de rata (Hagiwara y Kawa, 1984) y ratón (Liévano et al., 1996, Arnoult et al., 1996a; Santi et al., 1996) sólo presentan corrientes de Ca²⁺ del tipo de bajo umbral de activación cuya farmacología indica que posiblemente participan en la fisiología del espermatozoide. Otras características importantes de los canales tipo T que también los distinguen de otros CCDV son: una inactivación rápida que requiere de voltajes hiperpolarizantes más negativos de -80 mV para su remoción, tienen deactivación más lenta 2-5 ms vs 0.13 ms para los de alto umbral), la corriente unitaria de estos canales es la menor (~ 8 pS) y su secuencia de permeabilidad es Sr²⁺>Ca²⁺>Ba²⁺ (Bourinet et al., 1996, Ignacio González, comunicación personal), mientras que los CCVD de alto umbral son más permeables al Ba²⁺, que al Ca²⁺ (Huguenard., 1996) .

Estructuralmente hablando, los CCDVs son glicoproteínas heterooligoméricas. Se componen por la subunidad $\alpha 1$, que constituye el poro, en asociación con subunidades regulatorias $\alpha 2$ - δ , β y, algunos de ellos, la subunidad γ (figura 7). Se conocen 10 genes que codifican para la subunidad $\alpha 1$ ($\alpha 1A$ -I y $\alpha 1S$). La expresión específica de las diferentes variantes de $\alpha 1$ sugiere (aunque no en forma inequívoca) que las corrientes clasificadas electrofisiológicamente corresponden a una identidad específica de $\alpha 1$. Las corrientes L corresponden a canales formados por las subunidades $\alpha 1S$, $\alpha 1C$ y $\alpha 1D$, las P/Q a canales

formados por la subunidad $\alpha 1A$, las N a la subunidad $\alpha 1B$ y los R/T a la $\alpha 1E$ y $\alpha 1G-I$ (Tsien et al., 1995; Cribbs et al., 1998; Pérez-Reyes et al., 1998a,b) (Tabla 2).

Los canales dependientes de voltaje, poseen seis segmentos transmembranales (S_1 a S_6) con un segmento (S_4) que es el sensor de voltaje, cargado positivamente (Stühmer y Latorre, 1996). El filtro de selectividad de los CCDVs está formado por un anillo de glutamatos en la región del poro. La identidad estructural de la compuerta de inactivación rápida dependiente de voltaje en los CCDVs se localiza dentro del segmento transmembranal S_6 junto con las regiones extracelular y citoplásmica adyacentes al mismo (Zhang et al., 1994). La región carboxiterminal posterior al aminoácido 1673 la modula (Klöckner et al., 1995; Parent et al., 1995). Esta compuerta de inactivación difiere de la de canales de K^+ y de Na^+ . En estos canales la compuerta de inactivación rápida está constituida por la porción N-terminal (en los de K^+) o por la horquilla entre los segmentos transmembranales 3 y 4 (en los canales de Na^+), que ocluyen el poro por el lado citoplásmico en forma dependiente del voltaje. Además, los CCDVs (excepto el codificado por $\alpha 1E$) presentan inactivación dependiente de Ca^{2+} , que corresponde a secuencias consenso localizados entre las posiciones 1572 y 1652 en la subunidad $\alpha 1C$ (Zühlke y Reuter, 1998; Soldatov et al., 1998).

La coexpresión de las diferentes subunidades $\alpha 1$ con las subunidades accesorias (principalmente las β) modifica las características cinéticas y de voltaje dependencia de las corrientes, lo que ha creado controversias en la correlación gene-corriente iónica, en especial en las corrientes del tipo T (Williams et al., 1994, Meir y Dolphin, 1998). Por ejemplo, la expresión de la subunidad $\alpha 1E$ en combinación con diferentes subunidades accesorias ha resultado en la expresión de corrientes que se asemejan a las de tipo T, en unos sistemas (Soong et al., 1993; Bourinet et al., 1996, Stephens, et al., 1997), o corrientes cuya dependencia del voltaje, selectividad y susceptibilidad a bloqueadores los identificarían como canales de alto umbral (Williams et al., 1994; Yassin et al., 1996). En este mismo sentido, Piedras-Rentería et al. (1997) y Piedras-Rentería y Tsien (1998), determinaron la identidad genética de las corrientes T en miocitos cardiacos y en neuronas cerebelares, respectivamente. En ambos casos las corrientes se abolieron empleando oligonucleótidos diseñados contra regiones específicas de $\alpha 1E$. Por otro lado, recientemente se clonaron los genes $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$, que expresados heterológamente dan por resultado corrientes T típicas (Pérez-Reyes et al., 1998a,b; y Cribbs et al., 1998). Estos

Tabla 2. Propiedades estructurales, biofísicas y farmacológicas de los CCDVs.

	Canal L ₁	Canal L ₂	Canal L ₃	Canal N	Canal P/Q	Canal R/T?	Canal T	Canal T
Subunidad α_1	S ¹	C ¹	D ¹	B ¹	A ¹	E ^{4,5,6}	G ²	H e I ^{9,10}
Umbral de Activación	Alto (Alrededor de -30 mV) ¹	Alto ¹	Alto ¹	Alto ¹	Alto ¹	Alto ⁷	Bajo (Alrededor de -60 mV) ²	Bajo (Alrededor de -60 mV) ¹⁰
Inactivación	Lenta (no completa en menos de 300-500 ms) ¹	Lenta (no completa en menos de 300-500 ms) ¹	Lenta (no completa en menos de 300-500 ms) ¹	Menos lenta (completa en menos de 300-500 ms) ¹	Muy lenta (completa en alrededor de 19-28 ms) ¹	Rápida (completa en alrededor de 19-28 ms) ⁸	Rápida ($\tau = 5-6$ ms a -30 mV) ²	Rápida ($\tau = 20$ ms a -30 mV) ¹⁰
Deactivación	Rápida ¹	Rápida ¹	Rápida ¹	Rápida ¹	Rápida ¹	Lenta ⁸	Lenta (2.5 ms a -80 mV) ²	Lenta (alrededor de 6.5 ms a -80 mV) ¹⁰
Bloqueo	DHP ¹	DHP ¹	DHP ¹	ω -Conotoxina (fracción GVIA) ¹	ω -Agatoxina (fracción IVA) ¹	Resistente a DHP, ω -Cono y ω -Aga ¹	Mibefradil (Ro 40-5967) ³	Mibefradil (Ro 40-5967) IC ₅₀ = 1.4 μ M ¹⁰
Localización	Músculo esquelético	Músculo cardiaco y liso	Tejido neuroendocrino	SNC y periférico	Cerebro	Cerebro, corazón y células espermatozógenas ⁶	Cerebro, corazón ² y células espermatozógenas ¹¹ .	Riñón, hígado, corazón y cerebro ¹⁰

Referencias:

- 1) Latorre, et al., 1996. 2) Pérez-Reyes *et al.*, 1998a. 3) Clozel, JP *et al.*, 1997. 4) Piedras-Rentería *et al.*, 1997. 5) Bourinet, E. *et al.*, 1996.
 6) Liévano, A *et al.*, 1996. 7) Ellinor *et al.*, 1993. 8) Zhang, *et al.*, 1993. 9) Pérez-Reyes *et al.*, 1998b. 10) Cribbs *et al.*, 1998.
 11) Espinosa *et al.*, 1999.

autores concluyen que $\alpha 1G-I$ codifican para corrientes T y señalan como diferencias importantes con respecto a otros $\alpha 1$, la carencia de sitios consenso de glicosilación así como de sitios de asociación con las subunidades β . Sin embargo, Meir y Dolphin (1998), expresaron diferentes subunidades $\alpha 1$ (B, C y E) en células que carecen de genes para CCDVs resultando, en todos los casos, en la expresión de corrientes de conductancia, dependencia del voltaje y cinética, similares a las esperadas para canales del tipo T. Además, en ese mismo trabajo, con los tres genes se observó también otro grupo de transiciones con propiedades biofísicas que las clasificarían dentro de los CCDVs de alto umbral. Estas transiciones de mayor conductancia aparecieron principalmente cuando coexpresaron las $\alpha 1$ con subunidades accesorias. En conclusión, la identidad genética de las corrientes de CCDVs requiere de mayor investigación, particularmente

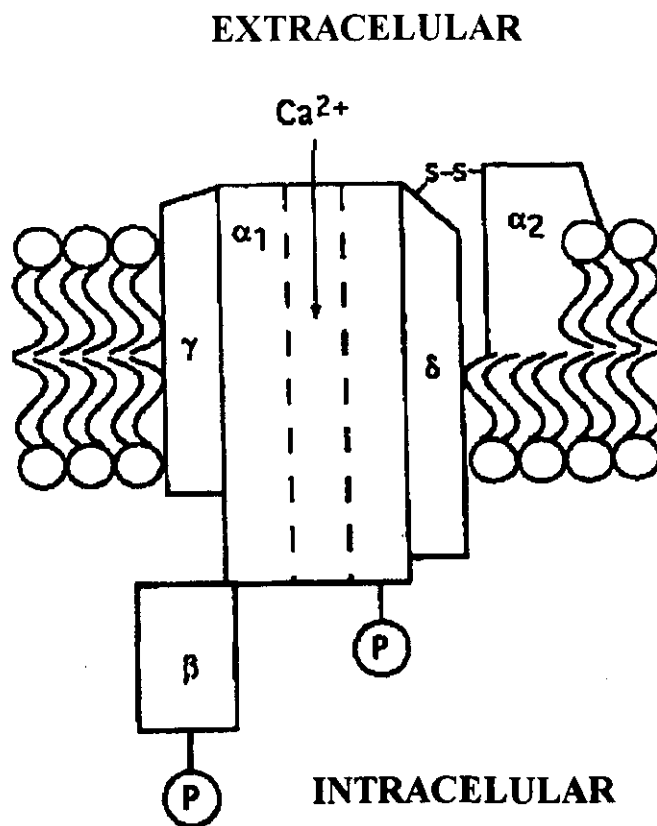


Figura 7. Modelo Estructural de los CCDVs. Estos canales se forman por la subunidad $\alpha 1$ (la que contiene el poro), la subunidades $\alpha 2\delta$, la subunidad β y en algunos casos, la subunidad γ . Cada una de las subunidades presenta diversas isoformas.

en relación a las corrientes T. Posiblemente las corrientes T se expresen en situaciones en las que carecen de la influencia de las subunidades β o de alguna otra subunidad accesoria (como sería el caso para los $\alpha 1G-I$ por no tener el sitio consenso de unión a la subunidad β o, para las demás $\alpha 1$, en aquellos sistemas heterólogos de expresión que en forma natural no expresan CCDVs).

1.4 Antecedentes Inmediatos (recapitulación).

Como se mencionó anteriormente durante la capacitación y en la RA ocurren flujos de Ca^{2+} (Florman et al., 1989, 1992; Baldi et al., 1996) y se ha sospechado de la participación de un canal de Cl^- a través de un receptor análogo al R-GABA_A durante la RA del humano y el ratón (Wistrom y Meizel, 1993; Roldán *et al*; 1994; Shi y Roldán, 1995). Las investigaciones que realizamos estuvieron encaminadas a estudiar la modulación del potencial de membrana, de canales de Cl^- (especialmente el R-GABA_A) y de la RA, por GABA y por bloqueadores de este tipo de canales. También se llevaron a cabo estudios sobre la modulación por albúmina sérica sobre canales de Ca^{2+} tipo T de células espermatogénicas que se cree también están presentes en el espermatozoide participando en procesos como la capacitación o la RA.

1.4.1 Canal de GABA tipo A y la RA.

Estudios electrofisiológicos indican que la progesterona potencia el efecto de GABA sobre el R-GABA_A en neuronas (Harrison *et al*; 1987; Wu *et al*; 1990) y que los barbitúricos lo pueden activar en ausencia de GABA. En estudios recientes, al utilizar agonistas de R-GABA_A tales como el muscimol y GABA, se observó que los espermatozoides llevan a cabo la RA, y al usar GABA y progesterona la RA se incrementa más que al usarlos por separado. La bicuculina y la picrotoxina (antagonistas del R-GABA_A) inhiben la RA inducida con progesterona o con GABA en espermatozoides tanto de ratón como de humano (Wistrom y Meizel, 1993; Shi y Roldán, 1995). Recientemente se ha reportado la participación del receptor a glicina (R-Gli) en la RA inducida con ZP en el espermatozoide de cerdo y humano. Basándose en el efecto de inhibidores específicos sobre la RA inducida con diferentes ligandos, en ese trabajo se sugiere que la iniciación de la RA por ZP y progesterona requieren de Cl^- pero que participan diferentes

receptores de canales de Cl^- , el R-Gli o el R-GABA_A, respectivamente (Meléndrez y Meizel, 1996).

1.4.1.1 Fenamatos, sus efectos en el canal de GABA tipo A y la hti-Ca. El ácido niflúmico (AN) es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo de la clase de los fenamatos que bloquea el transporte aniónico en eritrocitos. Es un potente inhibidor de corrientes de Cl^- activadas por Ca^{2+} y de los flujos de Cl^- del R-GABA_A, ambos expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (White y Aylwin, 1990; Woodward *et al.*, 1994). Se sabe además, que el AN inhibe el efecto de los halógenos y del CN^- en la unión del [³⁵S] t-butilbifosforotionato (TPBS) al R-GABA_A, posiblemente en la región del filtro de selectividad. Esto sugiere que el AN tiene también un sitio de unión dentro del poro (Evoniuk y Skolnick, 1988). Por otra parte en nuestro laboratorio se ha estudiado un fenómeno de hiperpolarización que se activa al poner Ca^{2+} (hti-Ca) a espermatozoides de ratón incubados en un medio en el que la concentración de este catión divalente es 0 nominal (Espinosa y Darszon, 1995). Se piensa que esta hiperpolarización se deriva en parte de la apertura de un canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (figura 8A). Al usar bloqueadores de este tipo de canal (AN) se bloqueó el 40% de la hiperpolarización (figura 8 B,C). Además, datos preliminares en ese momento indicaban también que bajas concentraciones de AN potenciaban la hti-Ca. Este efecto bimodal es similar a lo observado para un R-GABA_A neuronal en el que los fenamatos también muestran un efecto bimodal.

Hipótesis 1. El GABA y el AN pueden modular a hti-Ca al afectar al R-GABA_A.

Hipótesis 2. El AN puede bloquear flujos de Cl^- que son importantes para la RA. Uno de sus blancos podría ser el canal R-GABA_A.

Para indagar sobre ambas hipótesis se estudió el efecto del AN sobre los cambios en el potencial de membrana que se presentan durante la hti-Ca, y sobre poblaciones de espermatozoides reaccionados con los inductores ZP, progesterona o GABA.

1.4.2 Registro de canales iónicos presentes en la cabeza del espermatozoide por la técnica de patch-clamp.

Al momento de haberse iniciado este trabajo, sólo se tenían reportes sobre canales unitarios del espermatozoide de erizo de mar estudiados por las técnicas de patch-clamp o en bicapas planas (Liévano *et al.*, 1985; Guerrero y Darszon, 1987; Liévano *et al.*, 1990; Morales *et*

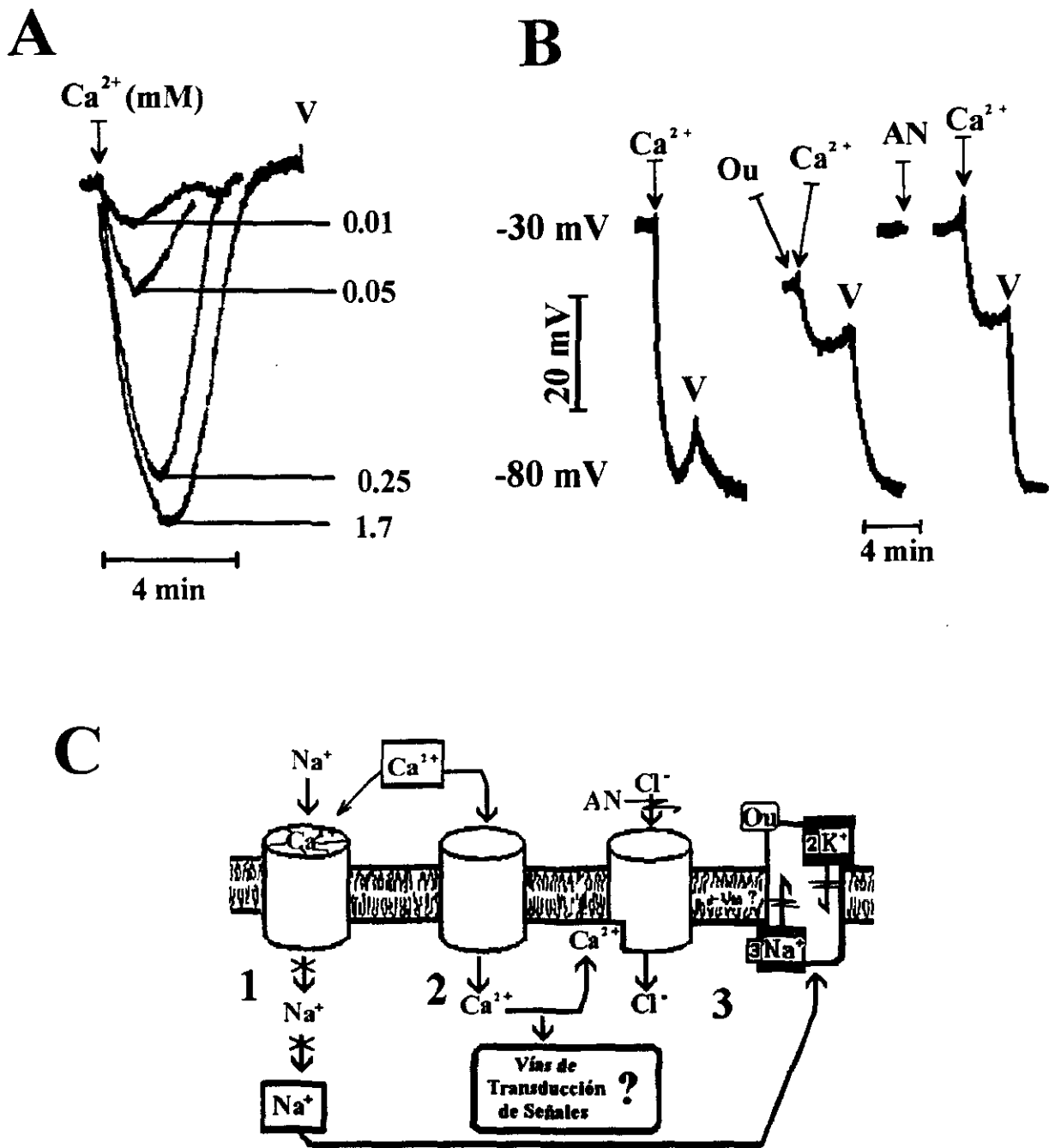


Figura 8. Hti-Ca. A) Inducción de la hti-Ca al adicionar Ca²⁺. Los números de la derecha indican la concentración de Ca²⁺ en mM. B) Inhibición de hti-Ca por ácido niflúmico (AN, bloqueador de canales de Cl⁻) y por ouabaina (Ou, inhibidor de la ATPasa Na⁺/K⁺). V indica la adición de valinomicina utilizada en la calibración (ver métodos) C) Modelo de hti-Ca. En ausencia de Ca²⁺, un canal de Ca²⁺ permite la difusión de Na⁺ hacia el interior de la célula aumentando las concentraciones basales de Na⁺ (1). Al añadir el Ca²⁺ se bloquea la entrada de Na⁺, permea el Ca²⁺ (2) y se activan en forma transitoria la ATPasa Na⁺/K⁺ y un canal de Cl⁻ (3). Esto lleva a eflujo de Na⁺ y a influjo de Cl⁻ con la consecuente hiperpolarización de la membrana.

al., 1993) y de estudios de canales unitarios en bicapas planas en el espermatozoide de ratón (Young et al., 1998; Cox et al., 1989, 1991). Poco tiempo después se reportó (usando la técnica de patch-clamp) la presencia de un canal activado por GMPc posiblemente presente en el flagelo o en cuerpos residuales del espermatozoide de ratón (Weyand et al., 1994), así como la presencia de canales de Ca^{2+} , canales catiónicos poco selectivos y un canal de Cl^- incorporados en bicapas planas a partir de vesículas de membrana plasmática (Beltrán et al., 1994; Labarca et al., 1995; Tiwari-Woodroff y Cox, 1995). En la técnica de bicapas planas, los canales iónicos se caracterizan en membranas artificiales que difieren en composición a la membrana nativa y que carecen de los sistemas regulatorios (segundos mensajeros, cinasas, citoesqueleto) presentes en la célula. Además, en ninguno de los reportes mencionados se tenía la certeza de la presencia de estos canales en la cabeza del espermatozoide de mamífero, y menos aún, su posible papel en eventos como la capacitación o la RA. Estos antecedentes indicaban la importancia de registrar y caracterizar los canales iónicos del espermatozoide de mamífero directamente por la técnica de "patch-clamp".

Hipótesis 3. Es posible registrar directamente canales unitarios de la cabeza del espermatozoide de ratón lo cual permitirá estudiar su modulación durante la capacitación o la RA.

1.4.3 La albúmina y el colesterol, hipótesis de su función en capacitación y por qué probarlas en corrientes T.

Durante la capacitación disminuye el contenido de colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide (Langlais et al., 1988; Go y Wolf, 1985, Suzuki y Yanaguimachi, 1989). Se piensa que esto se debe a la remoción del colesterol por proteínas presentes en el líquido folicular *in vivo* o por la albúmina sérica que se adiciona al medio de capacitación *in vitro* (Langlais et al., 1988; Go y Wolf, 1985, Suzuki y Yanaguimachi, 1989). Se sabe que los niveles de colesterol en la membrana plasmática influyen sobre sus propiedades fisicoquímicas cambiando su fluidez y la permeabilidad a diversos iones (Chang et al., 1995; Lundbaek et al., 1996; Bastiaanse et al., 1997). Se cree que la disminución del contenido del colesterol durante la capacitación favorece el flujo de Ca^{2+} y de HCO_3^- (Visconti et al., 1995a,b).

El espermatozoide es una célula muy pequeña en la que la caracterización de sus canales iónicos por la técnica de patch-clamp ha resultado sumamente difícil (Guerrero et al., 1987, y este

trabajo). Además, el espermatozoide carece de la maquinaria para la síntesis proteica, por lo que los canales que contiene su membrana se sintetizan en etapas previas a su maduración. Por ello nuestro grupo investigó el tipo de corrientes de Ca^{2+} presentes en las células espermatogénicas, así como la identidad del RNAm de subunidades $\alpha 1$. Estas células sólo muestran CCDV tipo T (Santi et al., 1996). Inicialmente, se determinó que el RNAm correspondiente a la subunidad $\alpha 1E$ como el más abundantemente expresado durante la espermatogénesis (Liévano et al., 1996) sugiriendo que la subunidad $\alpha 1E$ codifica para los canales tipo T (ver sección sobre canales de Ca^{2+} tipo T). Las evidencias farmacológicas sugieren que este tipo de canales están presentes en el espermatozoide maduro y que pueden participar en los procesos de capacitación y de RA (Arnoult et al., 1996). Con el objeto de comprender mejor la regulación de dichos canales y su posible influencia sobre la fisiología del espermatozoide, en colaboración con Pablo Visconti de la Universidad de Pensilvania se investigó el efecto de la albúmina, del colesterol y (por razones abajo descritas) del estradiol sobre las corrientes tipo T de células espermatogénicas.

Hipótesis 4. La albúmina puede influir sobre las propiedades de las corrientes de Ca-tipo T al regular los niveles de colesterol en la membrana plasmática. Esto se puede estudiar durante registros de patch-clamp en células espermatogénicas.

Objetivos:

Objetivos Generales. Caracterizar los canales iónicos importantes para el espermatozoide. El conocer su regulación permitirá ahondar en el conocimiento de la fisiología del espermatozoide, así como proponer fármacos con posibles efectos anticonceptivos.

Objetivos Particulares:

Determinar el efecto del GABA y/o del AN sobre la hiperpolarización transitoria inducida con Ca^{2+} . Esto permitirá indagar sobre la participación de canales de Cl^- (incluido el R-GABA_A) en este proceso y avanzar en el conocimiento de las propiedades de estas moléculas en el espermatozoide.

Determinar los cambios en el potencial de membrana durante la Reacción Acrosomal en el espermatozoide de ratón y el efecto del AN en dichos cambios. De estos datos se pretende determinar que canales iónicos participan en los cambios de potencial de membrana y como estos cambios en potencial pueden a su vez regular canales iónicos (v.gr. canales de Cl^-) u otras moléculas transmembranales (v. gr. la AC) modulados por voltaje.

Determinar el efecto del AN sobre la RA inducida con GABA, Progesterona o Zonas Pelúcidas. La comparación de la sensibilidad al AN de la RA inducida con cada uno de los agonistas mencionados, permitirá inferir la importancia de la participación de canales aniónicos en este proceso.

Caracterizar canales unitarios presentes en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de ratón y el efecto de la albúmina sérica y de esteroides en corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermátogénicas. El conocimiento de los canales iónicos de la membrana plasmática permitirá inferir de que manera participa cada uno de ellos tanto en los cambios de potencial de membrana como en los cambios en la concentración intracelular de diferentes iones durante la RA o durante la capacitación.

Materiales y Métodos:

II.1. Reactivos

La cianina 3,3 dipropiltiodicarbocianina (diS-C₃-(5)) se compró en Molecular Probes (Eugene, OR), se prepararon soluciones madres de 1 mM y 800 µM disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO). El AN, el 1,9 dideoxiforskolin (DDF), ácido 5-nitro-2(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), el Percoll, la progesterona, la valinomicina, el A-23187, el GABA, la ASB (fracción V), ASB libre de ácidos grasos y el medio capacitante M-199, se compraron de Sigma (SL, MO). Se prepararon soluciones madre 200 mM de AN y de progesterona, 100 mM de DDF y 20 mM de valinomicina en DMSO. El GABA (50 mM) se solubilizó en agua desionizada. El resto de los reactivos utilizados se compró considerando la mayor pureza disponible comercialmente.

II.2. Obtención y capacitación de los espermatozoides

Se utilizaron ratones CD-1 mayores de 16 semanas de edad sacrificados por dislocación cervical. Se recolectaron los espermatozoides a partir de la cola del epidídimo como lo describieron Lee y Storey (1985). Posteriormente estas células se suspendieron a una concentración de 6×10^6 células/ml en tubos eppendorf que contenía la solución de capacitación M-199. Las sales en este medio son (en mM): NaCl, 110; NaHCO₃, 10; KCl, 4.8; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 1.8; MgSO₄, 1.2; Hepes, 25; Lactato de Sodio, 20 ; Piruvato de Sodio, 1; Glucosa, 1 mg/ml y ASB, 4 mg/ml. El medio M-199 contiene además aminoácidos y vitaminas, entre otros componentes, con un pH 7.3 ajustado con NaOH. Las células se capacitaron por 30 minutos en un volumen de 3-5 ml a 37 °C con 5 % CO₂ y 95 % de aire.

II.3. RA

II.3.1. Inhibición de la RA. Después de capacitar a los espermatozoides, se tomaron 50-200 µl de células y se colocaron en tubos eppendorf cada uno con su respectivo ligando. Para la inhibición de la RA se añadió AN o DDF 5 minutos antes de adicionar el ligando y se indujo la RA durante 30 minutos a 37 °C.

II.3.2. Tinción del acrosoma. Al final de la inducción de la RA las células se fijaron con formaldehído al 10% por 10 minutos, se sedimentaron a 8000 rpm por 6 minutos y el sedimento

se suspendió en un buffer de fosfatos (PBS). Las células se depositaron en cubreobjetos, se secaron al aire y se tiñeron durante 5 minutos con Coomassie G-250 al 0.22 % en 50 % metanol y 10 % ácido acético glacial. Por último, los espermatozoides se lavaron con PBS, se montaron las laminillas y se observaron al microscopio. El acrosoma se ve como una banda de color azul marino hacia la parte dorsal de la cabeza (ver membranas de cabeza en figura 11 B). Se contaron un mínimo de 100 células cuantificando como células reaccionadas a aquellas que no presentan el acrosoma. Los datos se normalizaron restando la RA espontánea y considerando a la RA inducida con el ionóforo de Ca^{2+} A-23187 como 1.

II.4. Mediciones de Potencial de Membrana por Fluorometría.

La generación de colorantes fluorescentes sensibles al potencial de membrana se vió motivada por las dificultades (por dimensiones, geometría, etc.) para determinar éste parámetro en algunos sistemas biológicos. Actualmente se usan decenas de colorantes fluorescentes que se clasifican en dos grupos: colorantes de respuesta rápida (ms) y colorantes de respuesta lenta (segundos) (Freedman y Novak, 1989; Höpp et al., 1990). El colorante empleado en estos estudios fue la 3,3 dipropiltiodicarbocianina ($\text{diS-C}_3\text{-(5)}$; figura 9). Este colorante tiene una carga parcial positiva por lo que su difusión hacia el interior celular se ve favorecido a voltajes hiperpolarizantes (Eddy, 1989). Estos colorantes tienen una eficiencia cuántica mucho menor (apagamiento) en el interior celular por lo que la fluorescencia disminuye conforme el potencial de membrana se hace más negativo. Es decir, las deflexiones hacia abajo en un trazo de potencial cualquiera corresponden a una disminución de la fluorescencia y a una hiperpolarización. Se desconocen las razones precisas del apagamiento de los colorantes al entrar a la célula pero se sospecha que esto pueda deberse a la asociación del colorante a proteínas citoplásmicas o a que el colorante se agregue en el interior. En ambos casos la excitabilidad del colorante disminuiría explicando el apagamiento.

Cabe destacar que el colorante se puede distribuir hacia los organelos lo que añade señal a la generada por los cambios de potencial de la membrana plasmática. El principal organelo que contribuye a este artefacto es la mitocondria. La señal contaminante de la mitocondria se puede eliminar utilizando desacoplantes (ionóforos protónicos) que disipan específicamente el potencial de membrana mitocondrial (Terada., 1981).

II.4.1. Modulación de la hti-Ca por GABA y por el AN. Los cambios de potencial de membrana se registraron en un microfluórometro Hansatech de cámara redonda y con agitación (Reynaud et al., 1993). Estos experimentos se hicieron con células en suspensión a una concentración de 2.5×10^6 células/ml, a 37°C y con agitación ligera. La concentración de Ca^{2+} en presencia de 3 mM de EGTA en el medio-199 es de 139 nM, según el cálculo obtenido con el programa Maxc (Khrus Patton, Stanford University, CA, EEUU).

Se midieron los cambios de potencial de membrana utilizando el DiS-C₃-(5) a una concentración de 800 nM. Este colorante se excita a una longitud de onda de 620 nm y emite a 670 nm. Se añade el colorante a una cubeta para un volumen final de 900 μl . Se agregan las células y una vez alcanzada la fluorescencia basal (3-8 minutos de haber cargado las células), se adicionó 1 μl del desacoplante CCCP a partir de un solución madre de 100 μM con la finalidad de eliminar la contribución que la mitocondria tiene sobre el potencial de membrana. De esta forma la señal registrada es únicamente debida al potencial de la membrana plasmática. Después se indujo hti-Ca (Figura 8A) en presencia de GABA y/o AN adicionando 1.7 mM de Ca^{2+} . Seis a

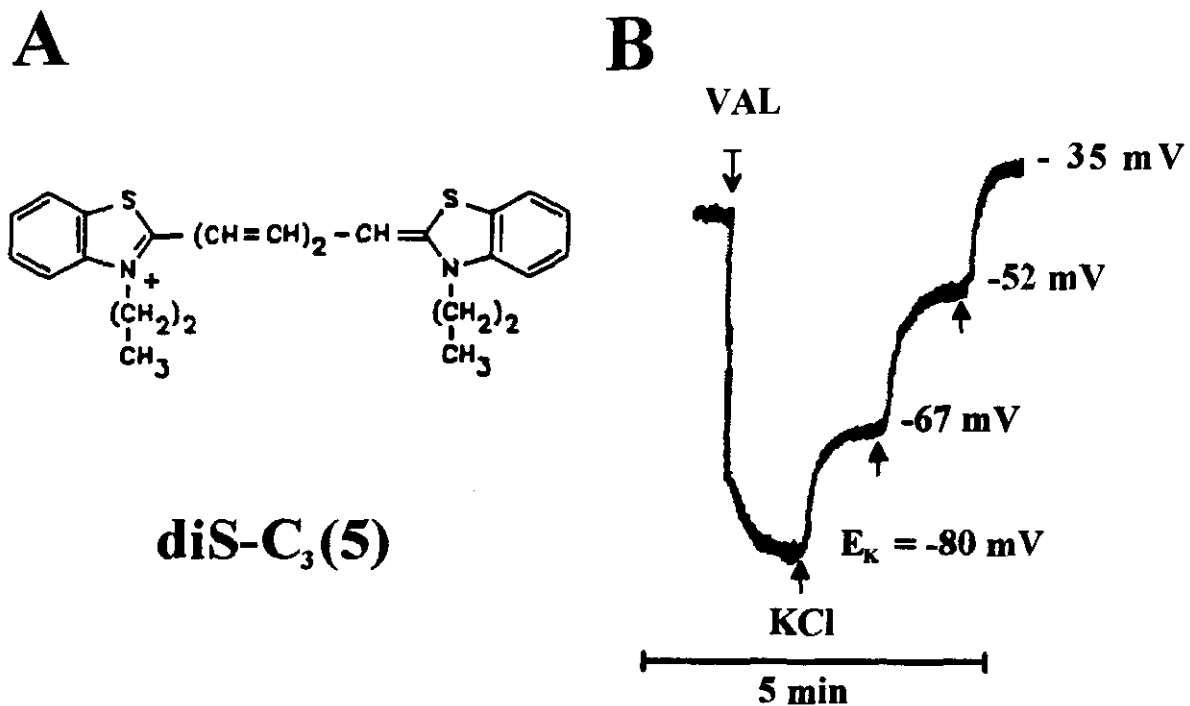


Figura 9. Determinación del potencial de membrana. A) Fórmula lineal de la diS-C₃(5). Calibración del potencial de membrana con valinomicina y adiciones de KCl.

ocho minutos después de haber inducido la hti-Ca (posterior a la repolarización), el potencial de membrana se tituló usando la valinomicina (ionóforo de K^+) y haciendo adiciones subsecuentes de K^+ (Figura 9B). El potencial de equilibrio para el K^+ (E_K), se calculó con la ecuación de Nernst (Hille, 1992), usando 120 mM de K^+ intracelular $[K^+]_i$ (Babcock, 1993) y 5.3 mM de K^+ externo $[K^+]_e$ inicial presente en el M-199. El potencial de reposo (E_r) se obtuvo mediante una regresión lineal de los datos teóricos (E_K) y de los experimentales (cambios de fluorescencia) a cada $[K^+]_e$ de acuerdo a Reynaud et al. (1993).

II.5 Electrofisiología

Si bien se ha avanzado en la determinación de las concentraciones iónicas y sus cambios en eventos fisiológicos en el espermatozoide, se requiere de un conocimiento más preciso de su localización subcelular y curso temporal. La mayor parte del conocimiento sobre los flujos iónicos durante la RA se ha generado determinando los cambios en concentraciones intracelulares totales (citoplasma y organelos) usando isótopos radioactivos o colorantes fluorescentes (revisado en Darszon et al., 1998). Un problema metodológico con los isótopos radioactivos es que no nos permiten conocer los cursos temporales en el rango de ms a segundos de estos eventos, necesario para definir patrones causa-efecto. Los estudios bioquímicos y farmacológicos de la RA tampoco permiten caracterizar en detalle el tipo de canal que participa en cada uno de los cambios iónicos. En cambio, las técnicas electrofisiológicas nos permiten estudiar las características específicas, el comportamiento temporal y la regulación de dichas entidades moleculares. En este trabajo se utilizó principalmente la técnica de patch-clamp ya que es la única que en la actualidad permite caracterizar *in situ* el comportamiento de los canales iónicos del espermatozoide, una célula muy pequeña y de morfología compleja.

Patch-clamp. La técnica de patch-clamp se basa en la utilización de una micropipeta de vidrio para el estudio de las corriente iónicas en células, vesículas y/o porciones de membrana. La micropipeta contiene una solución salina y está conectada mediante un electrodo de Ag/AgCl a un amplificador operacional. El amplificador está conectado a un osciloscopio que permite monitorear en tiempo real los cambios en la corriente, y mediante una interfase a una computadora. La punta del microelectrodo (0.5-2 μ M diámetro) se pone en contacto con la membrana celular y por succión o aplicando voltaje se logra obtener un sello mecánicamente

estable y de alta resistencia eléctrica ($\sim 10^9$ ohms). En el estudio de canales dependientes de voltaje, por medio de un programa (pclamp5.0), se pueden dar pulsos de voltaje o de corriente hacia la célula y se registran los cambios en la corriente o en el voltaje, que del estímulo resulten. Esta técnica permite estudiar tanto corrientes macroscópicas (corrientes iónicas a través de decenas o cientos de canales iónicos) en la configuración de célula completa, como las corrientes que pasan a través de un sólo canal iónico en microáreas de membrana (configuración de célula unida o de parches escindidos) (Auerbach y Sachs, 1984; Hille, 1992).

II.5.1 Registro de canales unitarios del espermatozoide de ratón (estrategias para facilitar el sellado). Para hacer las pipetas de patch-clamp se probaron diferentes tipos de vidrio y, al no ver ventaja alguna en la obtención de sellos con ninguno de ellos, se decidió utilizar sólo vidrio de silicato tipo Kimax o el 7052. Las pipetas tenían un diámetro $< 1 \mu\text{m}$ y una resistencia que osciló entre 5 y 15 Mohms. Los espermatozoides se lavaron durante 10 minutos en el Buffer A (en mM): NaCl, 50; sacarosa, 150; lactato de Na^+ , 20; piruvato de Na^+ , 1; glucosa, 5.6; EDTA, 1; benzamidina, 10; y aprotinina, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$; pH 8.4. La pastilla de células se obtuvo por centrifugación a $325 \times g$ durante 10 minutos en tubos eppendorf cilíndricos y se resuspendió en el mismo medio. Las células se dejaron reposar 10 minutos. El stock de células se almacenó en hielo. Para el experimento, se usaron alícuotas de espermatozoides de $10 \mu\text{l}$ diluidas en una cámara de registro de $\sim 250 \mu\text{l}$ de capacidad y se dejaron sedimentar durante 5-10 minutos. Las células se observaron bajo un microscopio invertido a un aumento de 400 X (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp) equipado con óptica Hoffman. Los experimentos se hicieron a $20\text{-}23^\circ\text{C}$ y las corrientes iónicas se monitorearon usando el amplificador Axoclamp 1-B (Axon Instruments, Foster City, CA). La señal se adquirió muestreando a 20-25 kHz, y filtrando a 2-5 kHz. El análisis se hizo mediante protocolos rutinarios del programa Pclamp6.

La obtención de sellos de alta resistencia (> 1 gigaohm) resultó sumamente difícil en el espermatozoide de ratón, tanto por su tamaño como por su morfología aplanada. La probabilidad de hacer sellos mejora si la boca de la pipeta está en una disposición paralela con respecto a la superficie de la célula (figura 10), de lo contrario el porcentaje de giga sellos es prácticamente 0%. En cerca del 7% de los intentos (73/1183) se obtuvieron sellos de alta resistencia y de estos, \sim del 75 % mostró actividad de canales. En el 25% de los giga sellos se obtuvieron parches

escindidos en forma espontáneamente. Ya que los parches en esta configuración se perdían relativamente rápido, no fue posible hacer sustitución iónica durante estos experimentos por lo que sólo se registraron corrientes bajo la solución de sellado. El análisis sólo se hizo de aquellos experimentos en los que se obtuvieron giga-sellos > 5 gigohms (~ 2% del total de intentos). La permeabilidad aparente en los parches escindidos se calculó de acuerdo a:

$$PX^+ \text{ pipeta}/PY^+ \text{ baño} = ([X^+]/[Y^+]) \exp(-E_{\text{inv}} zF/RT) \text{ (Labarca et al., 1995),}$$

para monovalentes. Y la permeabilidad aparente entre Ca^{2+} y los monovalentes, se calculó de acuerdo a:

$$PX^+ \text{ pipeta}/PCa^{2+} \text{ baño} = 4 [Ca^{2+}]/[X^+] \{-\exp(E_{\text{inv}} zF/RT) - [Y^+]/[X^+]\} \text{ (Hille, 1992),}$$

considerando equivalentes las permeabilidades de los monovalentes X^+ e Y^+ . E_{inv} corresponde al potencial de inversión de las corrientes y zF/RT tiene la acepción acostumbrada. Las soluciones utilizadas tanto en la pipeta como en el baño se indican en las leyendas de las figuras correspondientes.

Otros grupos han intentado sin éxito registrar canales iónicos del espermatozoide y, al igual que nosotros, piensan que los principales problemas para sellar se deben al difícil acceso a la membrana (célula extremadamente delgada) y a una membrana poco elástica y "quebradiza" (Harvey Florman y Bertil Hille, comunicación personal).

Hinchado del espermatozoide de ratón. Ya que la baja eficiencia en la obtención de giga-sellos hace imposible una caracterización detallada de los canales registrados en el espermatozoide, se buscaron alternativas para aumentar la probabilidad de obtener sellos de alta resistencia eléctrica. Debido a experiencia anterior en nuestro grupo con el espermatozoide de erizo de mar (Guerrero y Darszon, 1987; Babcock et al., 1992), usamos como un alternativa el hinchado del espermatozoide en medios hipotónicos. En el erizo de mar esto se logra diluyendo el agua de mar 1:10 pero conservando la concentración "normal" de Mg^{2+} (~ 25 mM). En esta especie el éxito en la obtención de sellos pasó de ~ 6 % a ~ 60 %. Se intentó un procedimiento similar en el espermatozoide de ratón (haciendo diluciones del medio de capacitación). Se hicieron

diluciones desde 1:1.1 hasta 1:20 (conservando 1.2 mM de Mg^{2+}), sin obtener el efecto esperado. Usando diluciones de $\sim 1:2$ se logra ver un ligero hinchado hacia la parte dorsal de la cabeza (figura 11A) y a diluciones mayores se observan desprendimientos de membrana indicando la discontinuidad de la misma. En el protocolo anterior y en los siguientes relacionados al hinchado del espermatozoide, estos se suspendieron a una concentración de $\sim 15\text{-}30 \times 10^6$ células/ml.

Pensamos que el fracaso en el hinchado se debe a características particulares del espermatozoide de mamífero que le dan una morfología extremadamente rígida, estas son: proteínas *sui generis* del citoesqueleto y el núcleo supercondensado (Ochs et al., 1986; Longo et

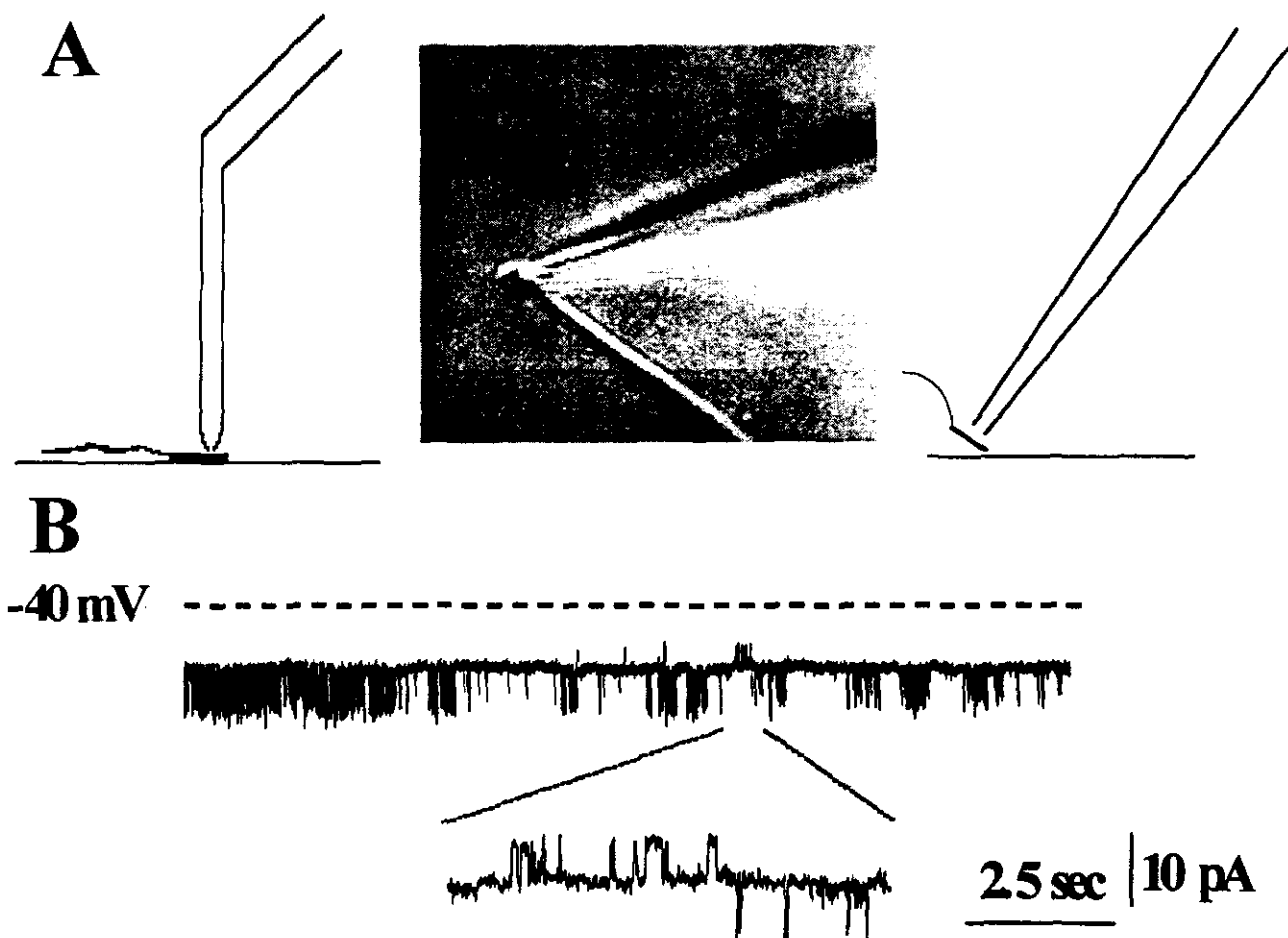


Figura 10. Patch-clamp del espermatozoide de ratón. A) Al centro se muestra una micro-fotografía de un espermatozoide unido a la pipeta de registro. A ambos lados de la fotografía, se esquematiza la aproximación perpendicular a la superficie espermática. B) Actividad de canal unitario en un registro de parche escindido. Este trazo se obtuvo a un voltaje de -40mV y muestra la presencia de dos tipos de transiciones (ver resultados). La línea discontinua indica el cero de corriente (---).

al., 1987; Hess et al., 1995; von Bulow et al., 1995). Se idearon protocolos encaminados a disminuir la rigidez de la célula atacando ambas características. Las protaminas espermáticas, moléculas fundamentales en la supercondensación del núcleo del espermatozoide, están asociadas íntimamente mediante puentes disulfuro por lo que se han usado medios reductores para favorecer la descondensación (Bellvé et al., 1993). Por otro lado, se sabe que el Zn^{2+} es importante para mantener la capacidad condensante *in vivo* (evita la oxidación de las protaminas), por lo que se

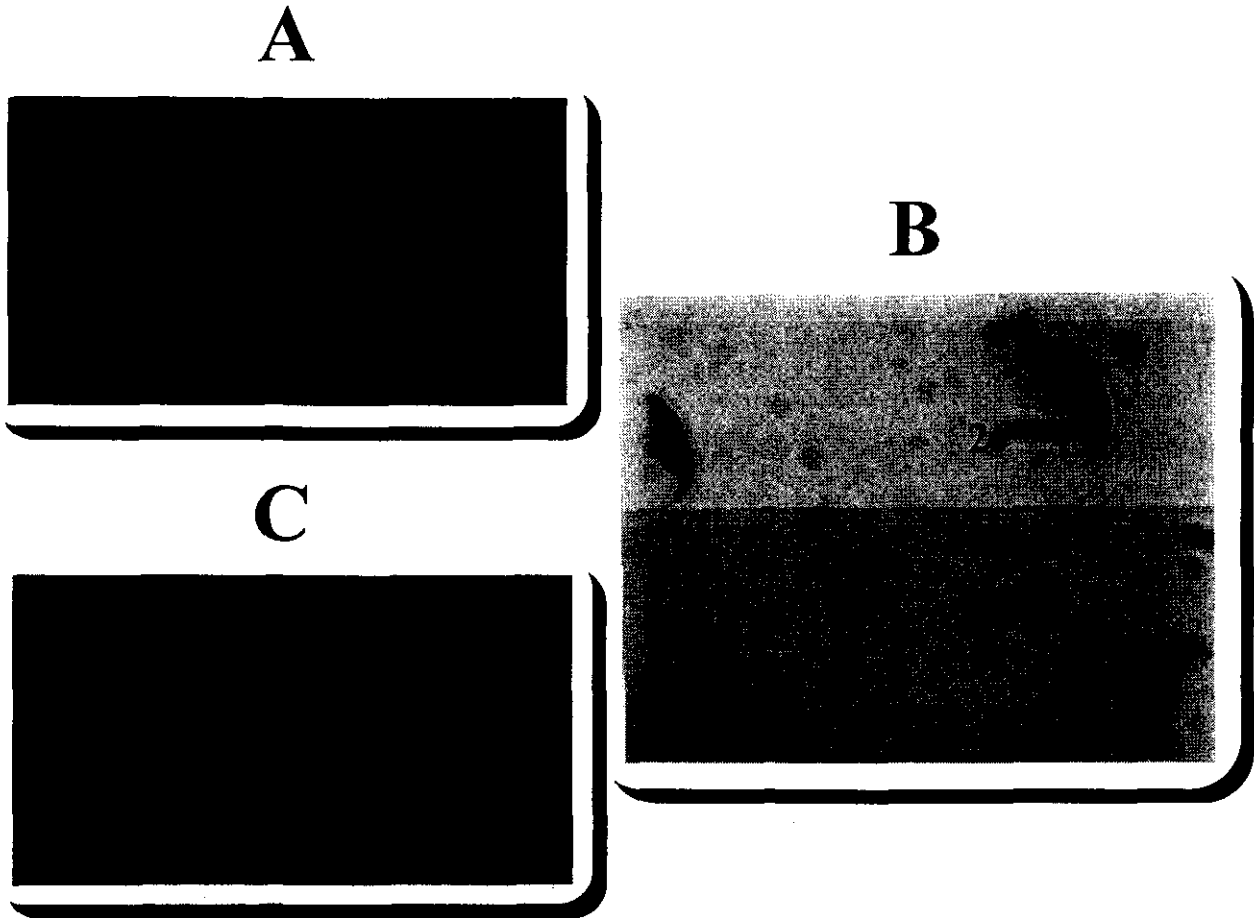


Figura 11. Hinchado y descondensación nuclear del espermatozoide. A) Vista lateral de un espermatozoide de ratón sometido a choque hipoosmótico en dilución 1:2. Hacia la parte dorsal (región acrosómica) de la cabeza se observa un pequeño abultamiento de la membrana (flecha). B) Descondensación nuclear (en presencia de DTT) de espermatozoides decapitados con tripsina. Hacia la izquierda se observan las membranas de la parte craneal de la cabeza de 2 espermatozoides (1). El núcleo, en proceso de descondensación, se tiñe de color azul marino (2). El material genético de las cabezas sin discontinuidades membranales no se tiñe (3) y el acrosoma se ve como un franja azul marino hacia la parte dorsal. C) Espermatozoide sometido a alta fuerza iónica. Se observa el "blebbing" de la cabeza (flecha). A) y C) se tiñeron con 5 μ M del colorante lipofílico C_6 -NBD-HPC (Molecular Probes, Eugene, OR), B) se tiñó con azul de coomasie G-250 (ver tinción para reacción acrosomal).

se adiciona EDTA en los medios decondensantes (Kvist 1982). La descondensación nuclear se llevó a cabo incubando a los espermatozoides en 2-5 mM de ditioneitol (DTT) por 20-40' a temperatura ambiente. Estos autores (Kvist, 1982) señalan también que es importante que exista discontinuidad de la membrana plasmática para que el DTT actúe, lo cual se puede lograr removiendo la cola del espermatozoide. Para ello, previamente a la incubación en DTT, los espermatozoides se decapitaron con tripsina al 0.1 % durante 10 minutos en Buffer A (adicionado con 2.5 mM EDTA) y terminando la reacción con 1 % de ASB y 0.1% DNAsa.. En este caso se obtuvo membrana de la parte craneal de la cabeza (incluido el acrosoma). En la figura 11 B se observan cabezas completas, cabezas en las que el material genético está en proceso de descondensación, y membranas de la parte craneal de la cabeza. En esta figura el material obtenido se tiñó con coomasie G-250 lo cual permite ver el acrosoma (franja de color azul marino en la región dorsal de la cabeza). La desestabilización del citoesqueleto se intentó utilizando alta fuerza iónica (Longo et al., 1987; Yagi y Paranko, 1995) o utilizando fármacos que se supone tienen esta función (Forshcer y Smith, 1988; Shaha, 1994; Blankson et al., 1995). En los experimentos con alta fuerza iónica, se utilizaron varias combinaciones y las que mejor funcionaron fueron: 1 M NaCl + 1 M MgCl₂ o 4 M NaCl durante 20-30' (ambas en tris 100 mM pH 9). En esta condición se obtuvo tanto la descondensación nuclear como la desestabilización del citoesqueleto (formación de "blebbing" en la cabeza, figura 11), pero al intentar hinchar a los espermatozoides pasándolos a una solución hipotónica, revirtieron tanto la descondensación del núcleo como la morfología de la cabeza. La reversión se inhibe si al final de la incubación en alta fuerza iónica se agregan 80 µM DTT. En relación a experimentos con fármacos desestabilizadores del citoesqueleto, se usaron en forma aislada o combinada, concentraciones 0.1 a 50 µM de vinblastina (contra microtúbulos), citocalasina (contra microfilamentos) o ácido okadaico (contra filamentos intermedios) y después se sometió a los espermatozoides a medios hipotónicos 1:2. Además de que con ninguno de los tratamientos se obtuvo un hinchado prominente de los espermatozoides, se probó hacer el sellado de las células o membranas post-tratamiento y tampoco se vió favorecida la obtención de sellos.

II.5.2 Registro electrofisiológico de células espermatogénicas. Las células espermatogénicas se obtuvieron por disociación mecánica a partir de testículos de ratones adultos de la cepa CD-1.

Durante su extirpación, los testículos se liberan de la túnica albugínea y se almacenan en solución de disociación (solución de registro sin Ca^{2+} , a la cual se le añaden 100 μg de DNAsa por ml). Bajo un microscopio estereoscópico se disecciona y limpia de tejido intersticial una parte de los túbulos seminíferos con pinzas de disección. Se "exprime" cada segmento de túbulo (de 0.1 a 1 cm de longitud) para sacar las células espermatozógenas (en total se "exprimen" alrededor de 5 cm de túbulos seminíferos para un volumen total de 250 μl de solución de disociación). Las células se separan entre sí por medio de pipeteo suave. Tanto la disociación como el almacenamiento de las células se hace a 4° C. Se tomó una alícuota de 10 μl de células resuspendidas y se dejaron sedimentar en la cámara de registro (cuadrado de lucita de ~3 cm de lado, 0.5 cm de espesor, perforación central cónica ocluida en su extremo más angosto con un cubreobjetos que hace las veces de piso transparente y que permite un volumen mínimo de ~ 250 μl). El registro de las corrientes se hizo a 20-23 °C, adquiriendo a 5 kHz y filtrando a 2 kHz. La solución externa fue (en mM): NaCl, 130; KCl, 3; CaCl_2 , 10; MgCl_2 , 2; NaHCO_3 , 1; NaH_2PO_4 , 0.5; glucosa, 5; Na-HEPES, 5; pH 7.4. La solución en la pipeta fue (en mM): CsCl, 100; CsF, 10; ATP-Mg, 4; fosfocreatina, 4; Cs-HEPES, 5; pH 7.3). En algunos experimentos se hizo sustitución iónica como se indica en las figuras correspondientes. La osmolaridad se ajustó a 300 ± 5 mOsm con NaCl (para la solución externa) o 275 ± 5 mOsm con CsCl (para la solución interna), midiéndola en un osmómetro (Osmette, Precision Systems Inc., Natick, Mass.). Se registraron simplastos por tener corrientes más grandes, ser más fáciles de registrar y porque se ha reportado que las corrientes que presentan son esencialmente idénticas en densidad y parámetros cinéticos a los de células únicas (Santi et al., 1996). Los registros se hicieron en la configuración de célula completa y se usaron protocolos preestablecidos para activación e inactivación en estado estacionario (ver pies de figura). En todos los casos se midió la capacitancia de las células compensándola con los circuitos correspondientes del amplificador. Los ajustes de las curvas de activación e inactivación en estado estacionario se hicieron de acuerdo a Santi et al. (1996). La curva de activación se elaboró transformando la corriente al pico a cada uno de los voltajes a valores de conductancia mediante la relación $g_{\text{Ca}} = I_{\text{Cap}} / (V_m - E_{\text{Ca}})$, donde I_{Cap} es la corriente al pico, V_m corresponde al voltaje aplicado y E_{Ca} es el potencial de reversión aparente obtenido por extrapolación lineal de la parte ascendente de la curva I-V. Los valores de conductancia normalizados se ajustaron a la relación de Boltzmann $g/g_{\text{max}} = \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_a]\}^{-1}$, siendo g la conductancia al pico, g_{max}

la máxima conductancia de Ca^{2+} al pico, V el voltaje aplicado, $V_{a1/2}$ es el voltaje de activación media y K_a es el factor de la pendiente de activación. Las curvas de inactivación en estado estacionario se obtuvieron normalizando la corriente al pico durante un pulso de prueba a -20 mV como función del voltaje del prepulso (de -95 a -35 mV con intervalos de 3 mV y 200 ms de duración). Estos datos se ajustaron a la relación $I/I_{\text{max}} = \{1 + \exp[(V - V_{i1/2})/k_i]\}^{-1}$, donde I es la corriente al pico, I_{max} es la corriente al pico durante el prepulso de -95 mV, V el voltaje del prepulso, $V_{i1/2}$ es el voltaje de inactivación media y k_i es el factor de la pendiente de inactivación.

II.6 Inmunodetección de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina durante la capacitación.

Estos experimentos fueron realizados de acuerdo a Visconti et al. (1995a,b). Los espermatozoides se incubaron en condiciones capacitantes. A los tiempos señalados en la figura 22, se tomaron alícuotas de $\sim 5 \times 10^5$ células, se centrifugaron y lavaron en PBS. Los espermatozoides completos se sometieron a electroforesis en gels de poliacrilamida al 10 % por la técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La transferencia de las proteínas a membranas de Immobilon P se hizo aplicando un potencial de 70 V por 2 horas a 4 C. La inmunodetección se hizo utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfo tirosina (clona 4G10; UBI) y se reveló por queminiluminiscencia usando un kit comercial (ECL, Amersham Corp.).

II.7 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados con una prueba t-student. Los valores con una $p < 0.05$ o con una $p < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

III.1 Mediciones del potencial de membrana.

Como ya se mencionó anteriormente, por alguna razón desconocida, en el espermatozoide de ratón (especie utilizada para este trabajo) se han hecho varios intentos fallidos para estudiar el pH_i y la $[Ca^{2+}]_i$ con colorantes fluorescentes a nivel poblacional. Por el contrario, los estudios fluorométricos de potencial de membrana (aunque en forma indirecta) han sido muy útiles para definir la identidad de transportadores en poblaciones de espermatozoides en suspensión, tanto en el erizo de mar como en el espermatozoide de ratón (Darszon et al., 1998). El potencial de reposo del espermatozoide de ratón así como los iones que lo modulan, fue determinado por vez primera en nuestro laboratorio (Espinosa y Darszon, 1995). Haciendo sustitución iónica, se demostró que el K^+ es el principal ion que modula el potencial de reposo (~ -42 mV), aunque al compararlo con el E_K (-80 mV), se infiere que hay una permeabilidad importante para otros iones. Por otro lado, se vió que al hacer sustitución de Ca^{2+} en presencia de $20 \mu M$ de EGTA (Ca^{2+} libre < 100 nM), la permeabilidad basal al Na^+ se incrementa contribuyendo significativamente al potencial de reposo. Además, la reconstitución del Ca^{2+} induce una hiperpolarización transitoria (hti-Ca) con valor promedio de ~ -30 mV (rango de -10 a -70 mV). Demostramos que la hti-Ca es altamente dependiente de la $[Na^+]_e$ y es sensible al bloqueo por ouabaina (70 % de bloqueo, IC_{50} $5.8 \mu M$), análogamente a lo observado al inyectar Na^+ en axones de neuronas de caracol (Thomas et al., 1969). En el caso del espermatozoide de ratón, la hti-Ca depende también de la $[Cl]_e$ y es sensible al AN (~ 40 % de bloqueo). Estos hallazgos sugieren la participación de la bomba Na^+/K^+ y de canales aniónicos durante la hti-Ca (ver modelo en figura 8 y Espinosa y Darszon, 1995).

III.1.1 Efecto de bloqueadores de canales aniónicos y del GABA sobre la hti-Ca.

El interés en estudiar el efecto del GABA y del ácido niflúmico sobre la hti-Ca, obedeció en parte al hecho de que resultados preliminares nos sugerían que el ácido niflúmico presenta un efecto bimodal sobre la hti-Ca (potenciación a dosis bajas y bloqueo a dosis mayores), análogamente a lo observado en un R-GABA_A neuronal expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (Woodward et al., 1994). Además, la hti-Ca se debe en parte al flujo de Cl^- (figura 8C) y se sabe que el R-GABA_A está presente en la membrana plasmática del espermatozoide y podría ser el

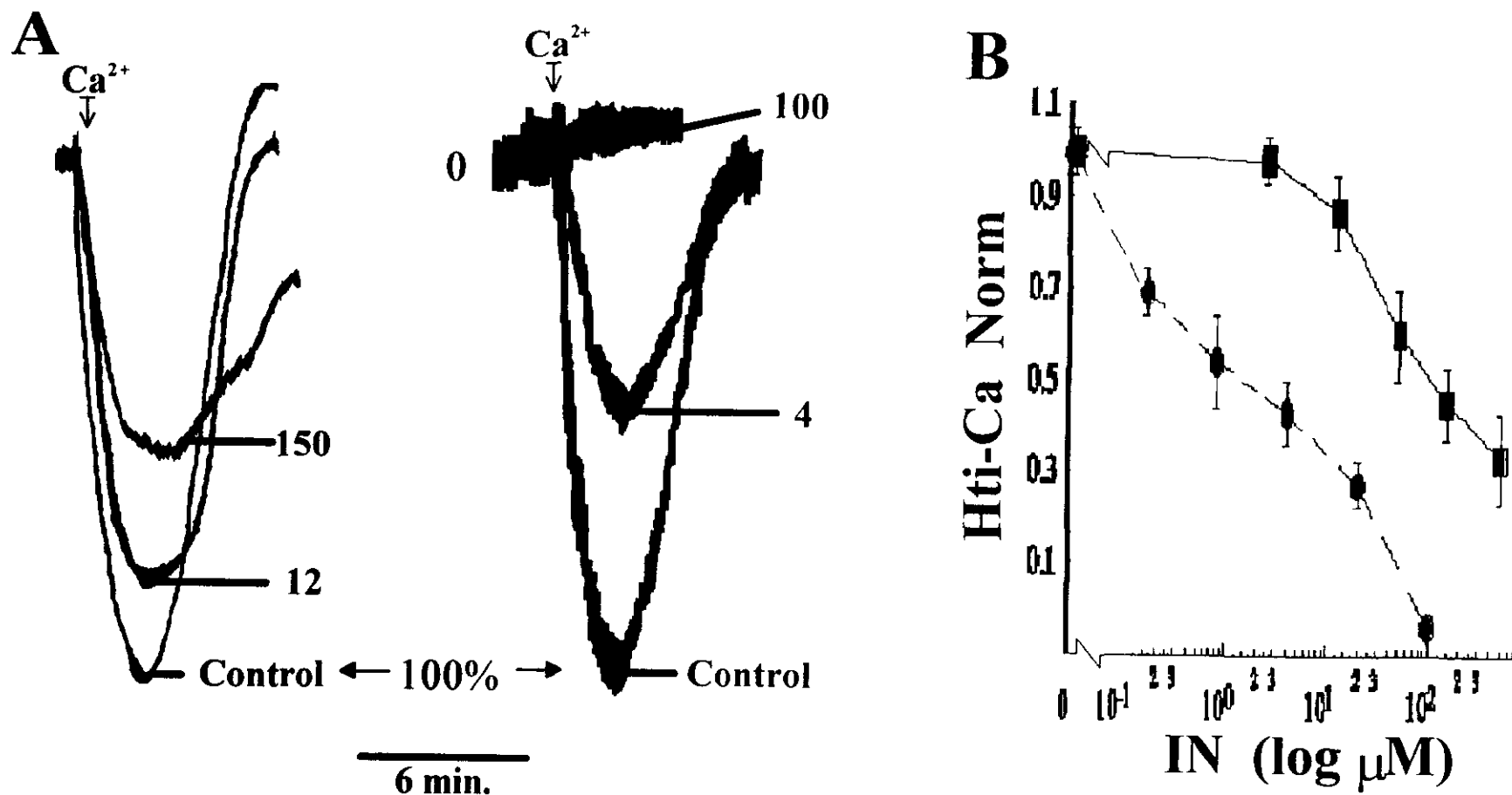


Figura 12. Inhibición de la hti-Ca con bloqueadores de canales aniónicos. A) Trazos de potencial de membrana mostrando la inhibición de la hti-Ca a diferentes [μs de AN (izquierda) o DDF (derecha). El 100% de la hiperpolarización corresponde a -45 ± 3.5 mV y -28 ± 2.1 mV, respectivamente. B) Dosis dependencia de la inhibición de hti-Ca por AN (cuadro) y DDF (círculo) (IC₅₀s aparentes de 100 y 1 μM). IN = inhibidor. (n = 4).

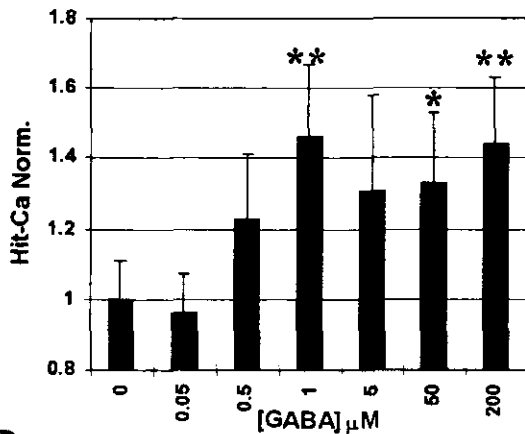
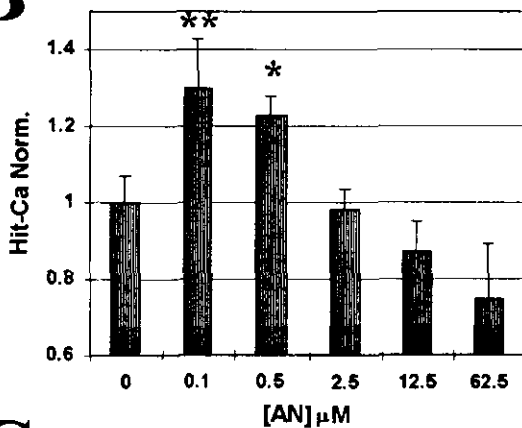
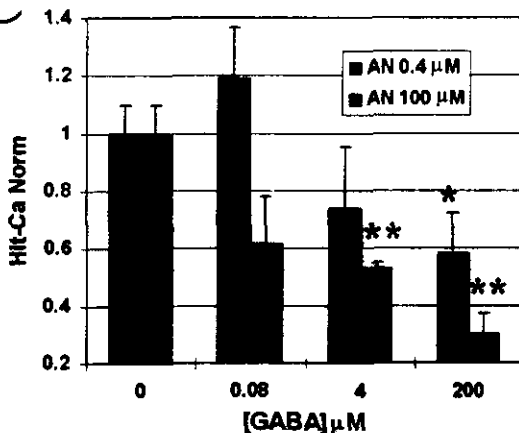
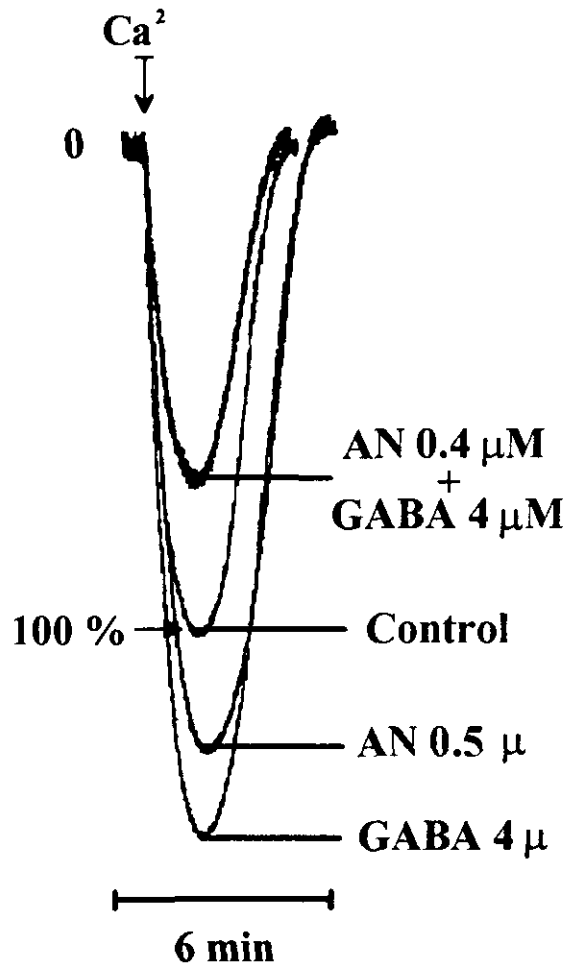
A**B****C****D**

Figura 13. Modulación de hti-Ca por AN y GABA. Dosis dependencia de la modulación de hti-Ca por GABA (A), AN (B) o cuando se aplican en forma combinada (C). Concentraciones micromolares de GABA o submicromolares de AN potencian hti-Ca. D) Hiperpolarización transitoria al añadir Ca^{2+} . La figura ejemplifica como, por separado el GABA ($4 \mu\text{M}$) o el AN $0.5 \mu\text{M}$, potencian hit-Ca. En contraste, la amplitud de la hiperpolarización se inhibe $\sim 30\%$ cuando se aplican en forma combinada. * diferente del control con un $p < 0.05$; ** diferente del control con una $p < 0.01$.

transportador aniónico permeante en este evento. Inicialmente determinamos la IC50 de bloqueadores de canales aniónicos (ácido niflúmico y el DDF) sobre la hit-Ca para espermatozoide suspendidos en el medio de capacitación M-199 (figura 12). El AN inhibió un

máximo del 60 % con IC50 de 100 μ M. El DDF fue más potente inhibiendo hasta un 100% a 100 μ M (IC50 1 μ M). Así mismo, experimentos preliminares con otros inhibidores de canales aniónicos como el dipiradimol y el ácido 5-nitro-2(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), refuerzan la hipótesis de la participación de canales aniónicos en la hti-Ca. Posteriormente, determinamos si el GABA presentaba algún efecto. En la figura 13A podemos observar como el GABA potencia la hti-Ca (10-50%) a concentraciones micromolares. Así mismo, concentraciones submicromolares del ácido niflúmico potencian la hti-Ca. (figura 13B). Para finalizar, determinamos si la susceptibilidad de la hti-Ca al AN se puede modular por GABA. En efecto, a concentraciones altas de GABA, la hti-Ca es más sensible al bloqueo por AN sin presentar un gran efecto sobre la potenciación a concentraciones bajas de ambos compuestos (figura 13C). Los trazos mostrados en la figura 13D ejemplifican los resultados anteriores. Estos experimentos sugieren fuertemente la participación del R-GABA_A en la hti-Ca y que su sensibilidad al bloqueo por el AN aumenta en la presencia de concentraciones altas de GABA.

III.1.2 Cambios en el potencial de membrana durante la RA.

Uno de los objetivos de este trabajo fue observar los cambios en el potencial de membrana durante la RA inducida con cada uno de los ligandos. En experimentos con GABA y progesterona no se observaron cambios significativos y reproducibles en el potencial de membrana del espermatozoide de ratón a pesar de que ya había reportes de una depolarización inducida por progesterona en el espermatozoide de humano (Foresta et al., 1993). Cuando se realizaron estos experimentos se desconocía el comportamiento del potencial de membrana durante la RA inducida con ZP. Posteriormente, Arnoult et al. (1996), caracterizaron una depolarización inducida con ZP o ZP3 en el espermatozoide de toro. También vieron un comportamiento similar en el espermatozoide de ratón. La señal en el espermatozoide de toro es más grande (y fácil de caracterizar) que en el ratón. Además, estos autores optimizaron las condiciones experimentales para evitar daño espermático durante la agitación. Ambos aspectos podrían explicar nuestra dificultad para medir los cambios de potencial de membrana en el espermatozoide de ratón mediados por agonistas de la RA.

III.3 Canales iónicos registrados con la técnica de patch-clamp.

La caracterización electrofisiológica de canales iónicos en el espermatozoide (tanto de mamífero como de erizo de mar) se ha hecho principalmente mediante la técnica de bicapas planas (revisado en Darszon et al., 1998). Si bien esta técnica es muy útil, tiene como inconvenientes que el canal se reconstituye en una membrana no nativa en la que el comportamiento del canal puede diferir del que presenta en la célula. Por otro lado, la reconstitución de canales del espermatozoide se ha hecho utilizando vesículas de membranas purificadas o añadiendo directamente los espermatozoides a la cámara de registro. En ambos casos no se puede tener certeza de la localización topográfica del canal en la célula completa. Para este trabajo estábamos interesados en caracterizar canales iónicos que participen en la RA del espermatozoide de ratón y, por tanto, se localizan en la región de la cabeza del espermatozoide. El patch-clamp, es la única metodología existente que permite la caracterización electrofisiológica *in situ* de los canales iónicos presentes en el espermatozoide. Anterior a este trabajo, existen sólo dos reportes del registro de canales iónicos por esta técnica en el espermatozoide de erizo de mar (Guerrero y Darszon, 1987; Babcock et al., 1992) y, uno en el espermatozoide de mamífero (Weyand et al., 1994). El reporte en el espermatozoide de mamífero se hizo registrando el cuerpo residual, cuya membrana de desecho corresponde a la región de la cola, por lo que no existía reporte alguno sobre los canales presentes en la cabeza de esta célula. Por todo esto, nos avocamos a estudiar los canales iónicos directamente sobre la cabeza del espermatozoide (modalidad de célula unida). De 42 sellos analizados con actividad de canales, en 14 ocasiones se formaron parches escindidos en forma espontánea. Frecuentemente se registraron transiciones con propiedades de amplitud y/o cinética claramente distintas, sugiriendo la presencia de diferentes tipos de canales en el mismo parche (fig. 10B)).

III.3.1 Canales catiónicos del espermatozoide de ratón. Las transiciones más frecuentes corresponden a un canal catiónico rápido (con tiempo abierto promedio (T_o) < 1 ms). La figura 14A muestra corrientes unitarias de este canal a diferentes voltajes en un parche escindido. Las transiciones presentan cinética rápida en forma de espigas, aunque también se pueden encontrar transiciones cuadradas (recuadros en la figura 14A). El potencial de inversión (E_{inv}) en la curva corriente voltaje (I-V, figura 14B) fue 10 mV, lo que corresponde a una PCs^+/PNa^+ de 0.66 (Cs^+

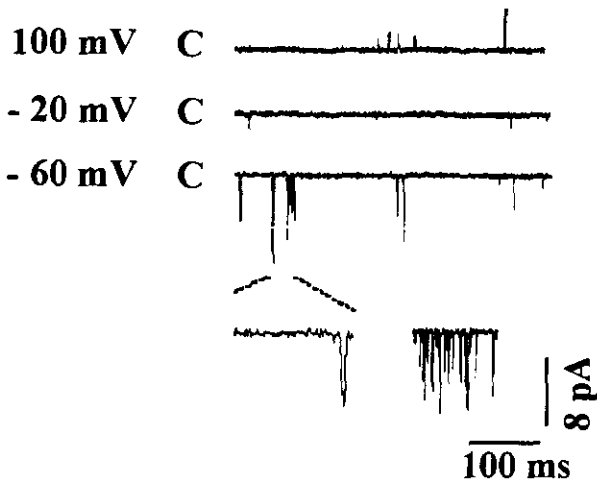
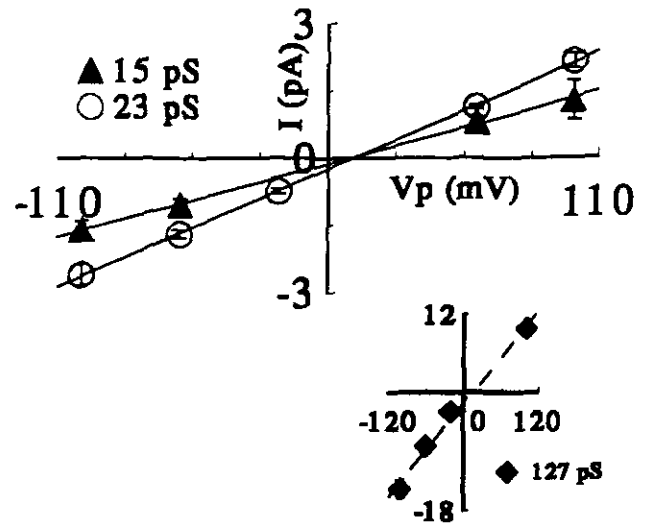
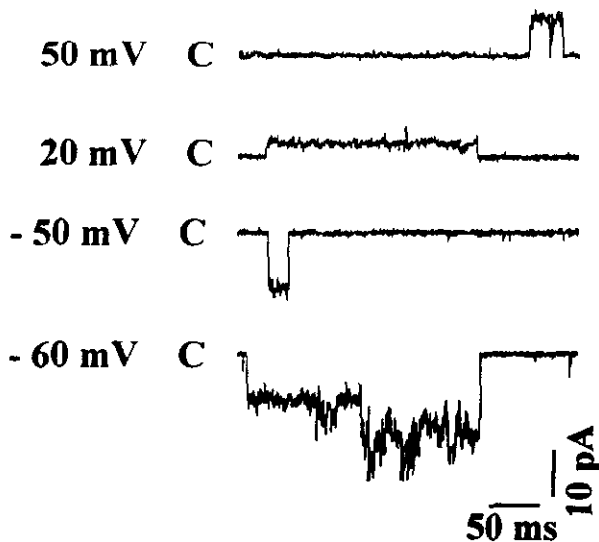
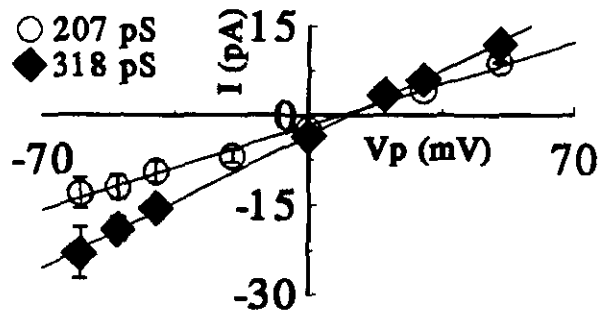
A**B****C****D**

Figura 14. Canales Catiónicos del espermatozoide de ratón. Los trazos mostrados en esta figura corresponden a canales iónicos registrados en un parche escindido. A) Canal rápido con varios subestados de conductancia. El recuadro a la izquierda muestra expansión temporal de 20 veces el área indicada. El recuadro a la derecha muestra transiciones en salva del trazo a -60 mV (mismas escalas). Las soluciones fueron (en mM): NaCl, 145; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 10; HEPES-Na, 10; pH 7.4 (baño); y CsCl, 120; CaCl₂, 0.05; HEPES-Cs, 10; pH 7.2 (en la pipeta). B) Curva I-V de las transiciones en A, E_{inv} = 10 mV. C) Trazos del canal catiónico lento de alta conductancia. La solución del baño igual que en A, en la pipeta la solución fue (en mM): KF, 30; KCl, 90; CaCl₂, 0.05; EGTA-K, 10 y HEPES-K, 10; pH 7.2. D) Curva I-V del canal en C, E_{inv} = 11mV. Los subestados principales de conductancia de este canal fueron de 207 y 318 pS.

pipeta 145/Na⁺ baño 150). En un experimento distinto la PK⁺/Na⁺ fue de 1.4, indicando una secuencia de permeabilidad de K⁺>Na⁺>Cs⁺, similar a la observada en bicapas planas para un canal catiónico modulado por AMPc en el espermatozoide de erizo de mar (Labarca et al., 1996). Se observaron transiciones de este tipo en 4 parches escindidos y en 8 registros en célula unida. En tres experimentos donde se obtuvieron registros a varios voltajes (en el rango de ± 100 mV), la Po no varió significativamente (0.012 ± 0.022). En ~ 25 % de estos experimentos se observaron periodos de disparo frecuente (salvas) con una Po > 0.3 a voltajes $\geq +40$ mV o ≤ -40 mV (recuadro derecho en figura 14A). Es interesante destacar que el comportamiento cinético es similar al de un canal del espermatozoide de ratón registrado en bicapas planas (Labarca et al., 1995).

En estudios en bicapas planas se reportó la presencia de un canal catiónico de alta conductancia en el espermatozoide de ratón (Beltrán et al., 1994; Labarca et al., 1995). Este canal es pobremente selectivo a Ca²⁺ y se asemeja a uno previamente caracterizado en el erizo de mar (Liévano et al., 1990). La figura 14C muestra transiciones catiónicas lentas registradas en un parche escindido de la cabeza del espermatozoide. Los subestados principales de conductancia fueron de 207 y 318 pS ($E_{inv} = 11$ mV; $PCa^{2+}/PNa^{+} = 6$; asumiendo $PNa^{+}/PK^{+} = 1$ (figura 14D)). Se observaron transiciones similares en 11 registros (tres de los cuales fueron en parches escindidos). Los registros de patch-clamp de este canal muestran cinética lenta con tiempos de apertura muy largos (decenas de ms a segundos), análogamente al comportamiento observado para el canal de Ca²⁺ reconstituido en bicapas planas.

III.3.2 Canal aniónico del espermatozoide de ratón. La figura 15A muestra transiciones de un canal aniónico a diferentes voltajes. La curva I-V indica la presencia de tres estados principales de conductancias de 22, 30 y 41 pS, medidos en la región óhmica de la curva. El E_{inv} fue de -30 mV, que es consistente con el esperado para un canal selectivo a Cl⁻, asumiendo un potencial de reposo de -85 mV (ver leyenda en figura 15B). A potenciales más positivos el canal rectifica y la Po aparente se incrementa (figura 15C). Algunos canales aniónicos como el R-GABA_A (Boorman et al., 1987), son poco permeables al F⁻, lo que puede explicar en parte la rectificación (30 mM F⁻ en la pipeta). El bloqueo por ácido niflúmico es dosis dependiente ($IC_{50} = 11$ μ M; figura 15D).

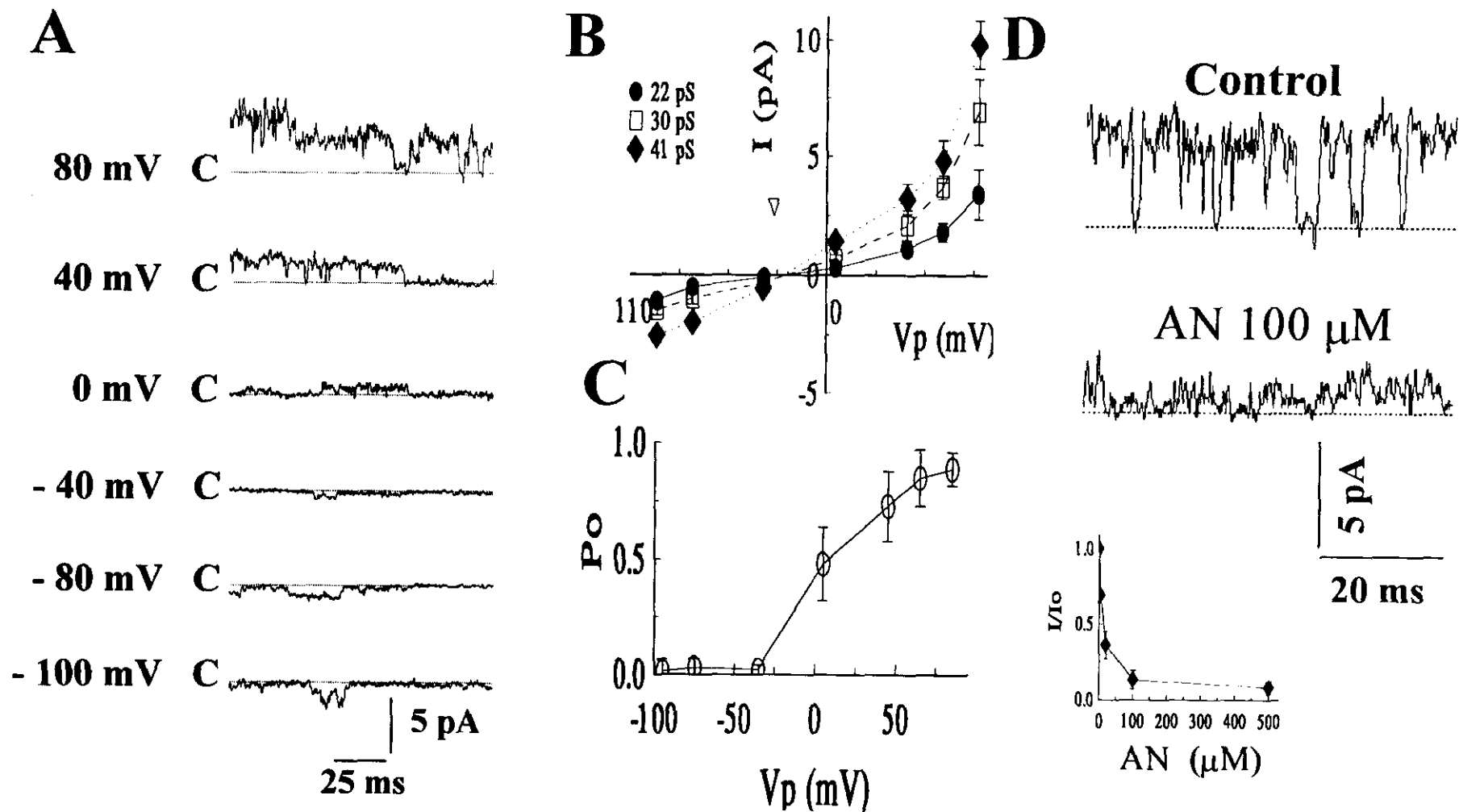


Figura 15. Canal aniónico del espermatozoide de ratón y su sensibilidad al AN. A) Registro en la configuración de célula unida a los voltajes indicados. La solución de la pipeta fue (en mM): NaCl, 120; NaF, 30; HEPES-Na, 10; pH 7.6. La C al lado de los trazos corresponde al 0 de corriente. B) Curva I-V del canal en A mostrando rectificación saliente a potenciales positivos y subestados de conductancia de 22, 30 y 41 pS en la región lineal (arriba). El Einiv (-30 ± 5 mV) corresponde al de un canal de Cl⁻ considerando: una concentración intracelular de 10 mM de Cl⁻, un potencial de reposo de -85 mV y corrigiendo para el potencial de unión líquida (-5 mV). El potencial de reposo se determinó con el colorante diS-C₃-(5) en poblaciones de espermatozoides suspendidos en la solución del baño (en mM: TEA-Cl, 60; TEA-MeSO₄, 70; CaCl₂, 15; HEPES-TEA, 10; pH 7.6. C) Po del canal aniónico medida durante 6.4 s a cada potencial (abajo). D) Trazo a +80 mV mostrando el bloqueo del canal aniónico con AN. Después del trazo control, la célula se incubó por 10 minutos a la concentración indicada del bloqueador. Recuadro, dosis dependencia del bloqueo.

Cómo se describe más abajo, el AN y otros bloqueadores de canales aniónicos inhiben la RA, por lo que se vuelve importante determinar si este canal corresponde al R-GABA o a algún otro canal aniónico que participe también en la RA. Debido a la dificultad para hacer patch-clamp en el espermatozoide, resulta poco práctico usar esta técnica para caracterizar en forma detallada sus canales iónicos. Una alternativa para ahondar sobre los canales aniónicos del espermatozoide es buscar este tipo de corrientes en las células espermatogénicas.

III.3.3 Canales aniónicos en las células espermatogénicas. Ya que el R-GABA_A participa en la fisiología del espermatozoide (Meizel, 1997; resultados en este trabajo), nos avocamos a indagar la presencia de este receptor por la técnica de patch-clamp (configuración de célula completa) en simplastos de células espermatogénicas. Se hicieron experimentos añadiendo GABA desde 1 hasta 100 μ M, fijando el potencial de membrana a -80 mV y en los que el potencial de inversión para el Cl⁻ era de + 40 mV (20baño/110pipeta). En ningún caso se evocaron corrientes al añadir el GABA (n = 6, no se muestra). Posiblemente esto se deba a que el R-GABA_A no se encuentra en

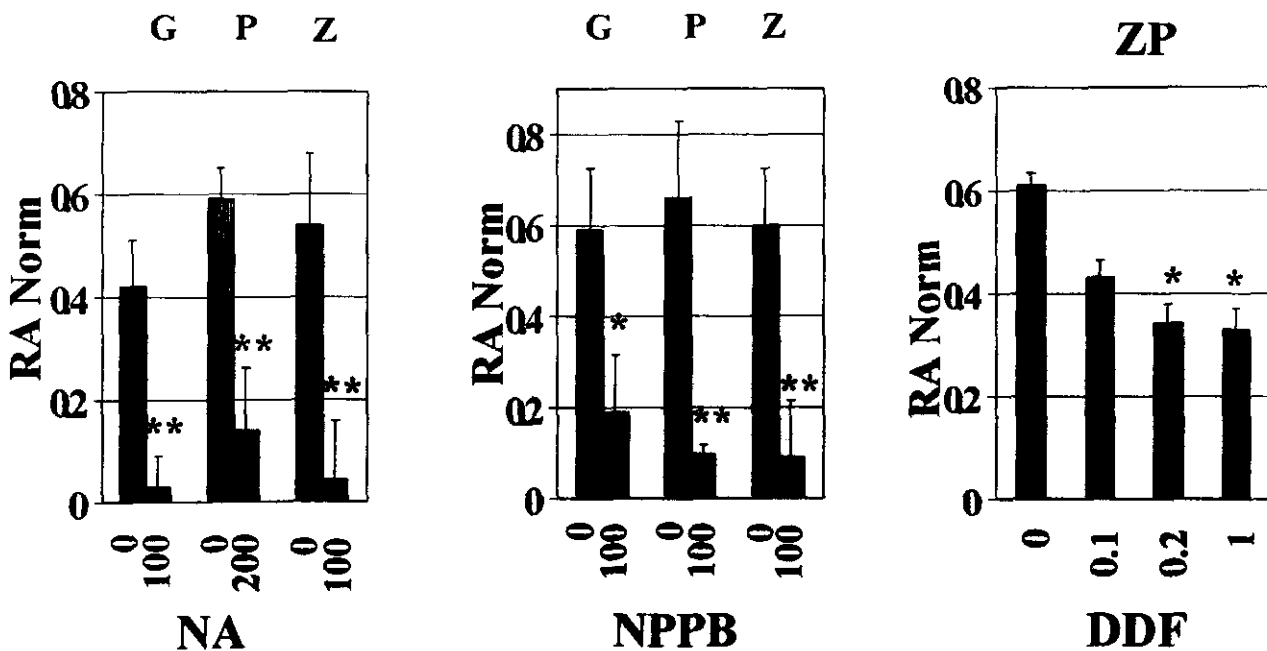


Figura 16. Inhibición de la RA por bloqueadores de transporte aniónico. Inhibición de la RA con AN (izquierda), NPPB (centro) o DDF (derecha). La RA se indujo con GABA (G), progesteron (P) o con zonas pelúcidas (ZP). Los números indican la concentración del bloqueador en μ M. * diferente del control con un $p < 0.05$; ** diferente del control con una $p < 0.01$.

las células espermatozógenas de los estadios registrados (paquiteno) o a que, aunque presente, esté en un estado no funcional. Otra explicación podría ser que se laven factores intracelulares importantes para la activación de las corrientes de este receptor (Gyenes et al., 1994). Considero lo anterior poco probable ya que la solución de la pipeta tenía ATP y, en algunos experimentos, nucleótidos cíclicos. Si bien no pudimos confirmar electrofisiológicamente la presencia del R-GABA_A en las células espermatozógenas, anteriormente se había demostrado la presencia de otro tipo de canal de Cl⁻ dependiente de voltaje (López González, 1995), aunque de menor sensibilidad al AN (IC₅₀ aparente de 100 μM) que el canal registrado en el espermatozoide (Espinosa et al, 1998a).

III.4 Inhibición de la RA

Uno de los usos prácticos que se puede derivar del estudio de canales iónicos en el espermatozoide es el de encontrar compuestos que los modulen (positiva o negativamente) y que inhiban la RA y por tanto la fecundación. En colaboración con J L de la Vega, como parte de su tesis de licenciatura (de la Vega Beltrán, 1997), se determinó la potencia de cada uno de los ligandos en la inducción de la RA y de bloqueadores de canales aniónicos como inhibidores de la misma. La concentración saturante de la respuesta para cada uno de los ligandos en la inducción de la RA fue de 0.125 μM para GABA, 45 μM para progesterona y de 5 ZP/μl para las zonas pelúcidas. En la figura 16 se muestra el efecto de los bloqueadores de transporte aniónico AN (izquierda), NPPB (centro) y DDF (derecha) sobre la RA inducida con cada uno de los ligandos. El ácido niflúmico presentó IC₅₀s de 1, 7 y 84 χ en la RA inducida con ZP, GABA y progesterona, respectivamente (de la Vega Beltrán). Para el NPPB las IC₅₀s fueron de 1, 11 y 1 μM, respectivamente (no se muestra). El DDF mostró un comportamiento diferente en la RA inducida con ZP (figura 16 C) o con progesterona, a 1 μM inhibe ~ 50%, pero conforme se aumenta la concentración del fármaco, se ve una disminución aparente en la inhibición (no se muestra), posiblemente debida a daño de las células. Estos resultados sugieren que los flujos aniónicos son muy importantes durante la RA inducida con cada uno de los tres ligandos, aunque cabe otra posibilidad (ver siguiente sección y la discusión).

III.5 Inhibición del canal de Ca^{2+} tipo-T en células espermatoogénicas por bloqueadores de canales aniónicos.

Las corrientes de Ca^{2+} tipo T en células espermatoogénicas son las únicas corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje que manifiestan estas células (Hagiwara y Kawa, 1984; Santi et al., 1996). La inhibición de estas corrientes es análoga a la farmacología de inhibidores de la RA (Arnoult et al., 1996; Darszon et al., 1998), por lo que se piensa que los canales de Ca^{2+} tipo T están presentes en el espermatozoide participando en este evento fisiológico fundamental. Si bien los inhibidores utilizados en este trabajo se emplean frecuentemente como bloqueadores de canales aniónicos, también se sabe que pueden afectar a canales catiónicos incluidos los CCDVs

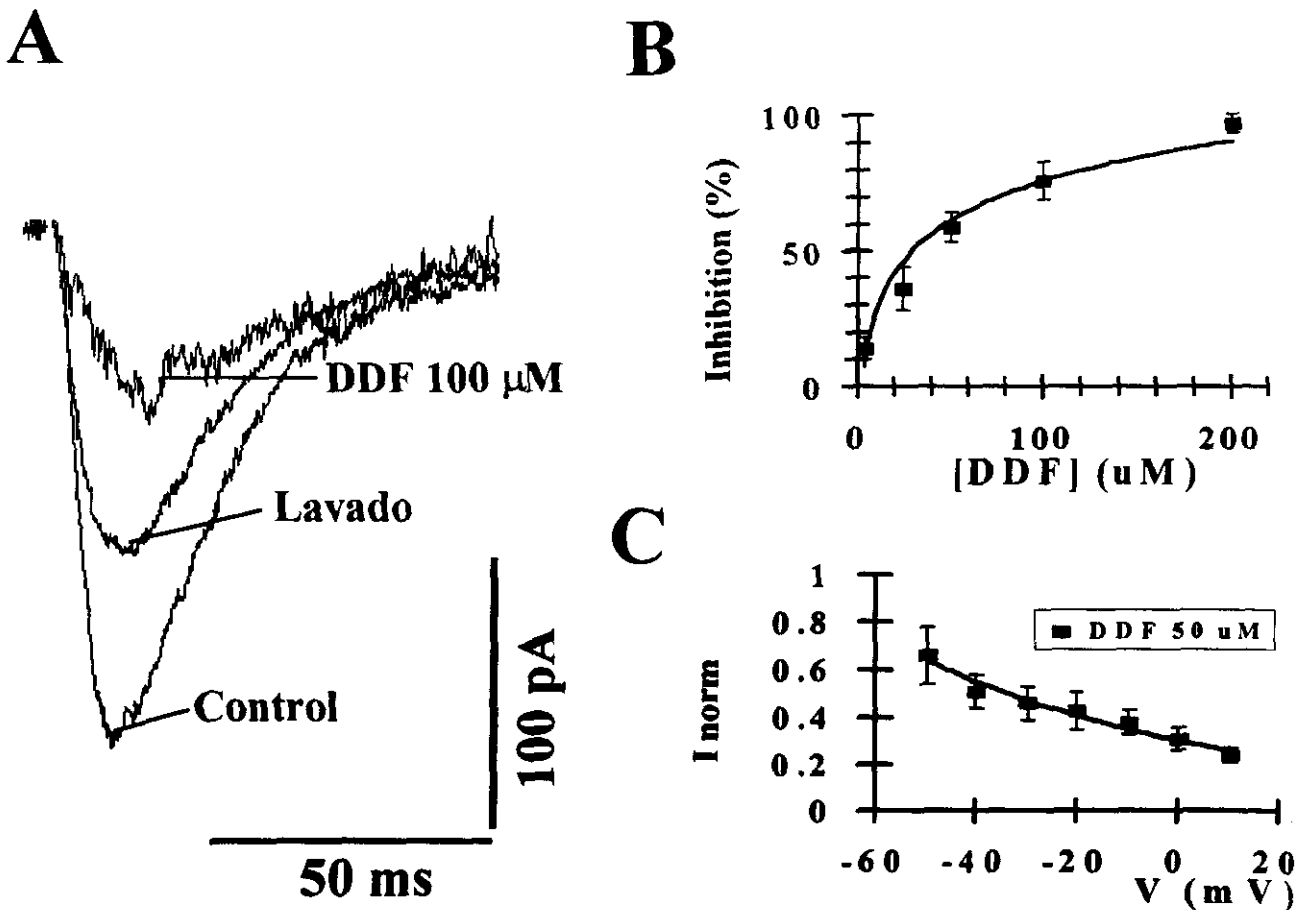
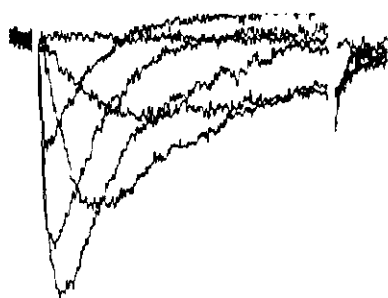
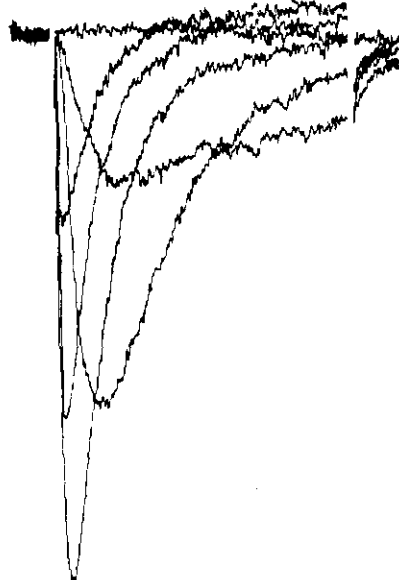


Figura 17. Inhibición de $\text{I}_{\text{Ca-T}}$ con DDF en células espermatoogénicas. A) Corriente representativa al aplicar un pulso de prueba a -20mV a partir de un potencial de mantenimiento de -90mV antes y 5 minutos después de agregar $100\ \mu\text{M}$ de DDF. B) Dependencia de concentración del bloqueo de $\text{I}_{\text{Ca-T}}$ con el DDF ($\text{IC}_{50} = 28\ \mu\text{M}$). C) Dependencia de voltaje del bloqueo en presencia de AN $50\ \mu\text{M}$. El bloqueo es mayor a potenciales

(Goegelein et al., 1990; Walsh y Wang, 1993; Doughty et al., 1998). Considerando lo anterior era importante determinar si estos fármacos modulan las corrientes T en células espermatozógenas. La figura 17A muestra la inhibición de I_{Ca}-T a una concentración de 100 μM de DDF. En las condiciones experimentales utilizadas, el lavado del inhibidor fue pobre (de 0 a 60%). La IC₅₀ para el DDF fue de 28 μM (17B). El bloqueo es dependiente de voltaje (17C), sugiriendo una interacción directa entre el fármaco y el poro del canal (ver discusión). También el AN y el NPPB inhibieron la I_{Ca}-T. La IC₅₀ para el AN fue de 43 μM. En el caso del DDF y el AN, la RA fue más sensible a estos compuestos sugiriendo que los canales T no son su blanco principal durante la inhibición de la RA (al menos en la RA inducida con GABA y ZP). El NPPB parece tener 2 sitios de unión con afinidades de 35 nM y 75 μM, por lo que el sitio de alta afinidad podría estar participando en la inhibición de la RA (ver Apéndice; Espinosa et al., 1999).

III.6 Modulación de I_{Ca}-T en células espermatozógenas por ASB.

La albúmina sérica es muy importante para la capacitación *in vitro* del espermatozoide de ratón. Se piensa que su efecto se debe a que la remoción del colesterol resulta en un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca²⁺ y al bicarbonato (Gong y Wolf, 1985, Visconti et al., 1995a,b). En ese mismo sentido, se piensa que el colesterol debe modular negativamente estas permeabilidades así como la fosforilación de proteínas importantes para la capacitación. Inicialmente hicimos experimentos añadiendo sulfato de colesterol 10-50 μM a células espermatozógenas después de un registro control de corrientes de Ca²⁺. Observamos que después de algunos minutos se inhibían significativamente las corrientes e inclusive en algunos casos desaparecían por completo. La interpretación de estos resultados se complicó ya que la mayoría de los registros se hicieron a tal grado ruidosos, que sospechamos de daño celular, poniendo en entre dicho un efecto específico del colesterol sobre los canales T. Al añadir albúmina en los momentos en los que el registro ya era muy ruidoso, mejoraba el registro y se recuperaba parte de la corriente, inclusive en casos en los que ya había desaparecido por completo. Decidimos entonces hacer experimentos, añadiendo la ASB y viendo su efecto sobre las corrientes T después de un registro control. En la figura 18A se muestra como 0.5% (~75 μM) de albúmina sérica bovina aumenta las corrientes de Ca²⁺ en un 100%. Para comparar la cinética

A**CONTROL****ASB 0.5% (~ 75 μM)**

50 pA
25 ms

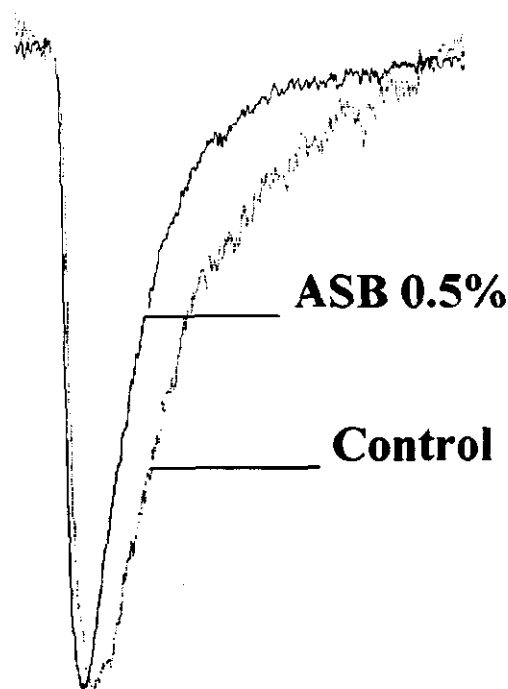
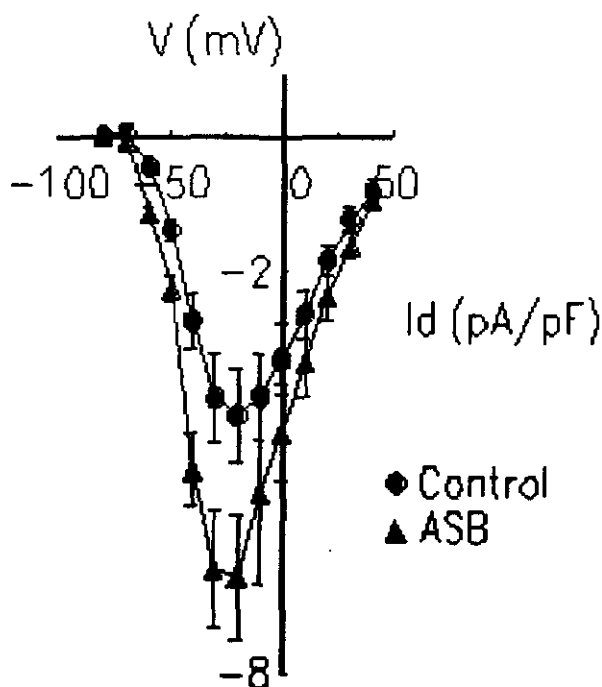
B

Figura 18. Potenciación de ICa-T por ASB en células espermatozógenas. A) Trazos a -70, -50, -40, -20, -10 y +10mV en la condición control (izquierda) y 2 minutos después de añadida la ASB 0.5% (~ 75 μM). B) Curva I-V promedio de la corriente al pico a los diferentes voltajes, antes (círculos) y después (triángulos) de añadida la ASB. C) Trazos normalizados para comparar las diferencias cinéticas de las corrientes potenciadas con las control a un pulso de -20 mV.

entre ambas condiciones, en la figura 18D se normaliza la amplitud de la corriente a un voltaje de -20 mV en el registro control y después de haber añadido la ASB. Se ve claramente que la cinética tanto de la activación como de la inactivación son más rápidas después de añadida la ASB. En la figura 19 se muestran las constantes cinéticas de activación e inactivación así como la dependencia de voltaje de la activación y de la inactivación en estado estacionario. Estos resultados indican que el tiempo necesario para llegar al pico de corriente disminuye en presencia de ASB. A un voltaje de -20 mV, el tiempo al pico pasa de 11 ± 0.7 ms a 7.7 ± 0.8 ms ($n=9$). La cinética de inactivación también es más rápida en presencia de ASB ($\tau_{\text{Control}} = 19.7 \pm 2.5$ ms, $\tau_{\text{ASB}} = 10.8 \pm 1$ ms, a -20 mV). Estos valores pueden representar un cambio real en las cinéticas del canal y/o un corrimiento en la dependencia de voltaje. Por ello determinamos la dependencia de voltaje de la activación y de la inactivación en estado estacionario. Si bien la ASB corre hacia la izquierda 3 y 5 mV los voltajes medios de ambos parámetros (ver figura 19B), este corrimiento no es suficiente para dar cuenta de los cambios en la cinética y, menos aún, de la potenciación en la amplitud de la corriente (ver Discusión).

Se sabe que la ASB tiene bolsas hidrofóbicas por lo que comúnmente se pueden encontrar ácidos grasos asociados a ella en proporciones de hasta 3:1 (lípidos:ASB) (Chen, 1966). Se ha demostrado que algunos de estos lípidos pueden modular positivamente o negativamente canales iónicos (Tigyi y Miledi, 1992; Kim, 1992; Damron y Bond, 1993) por lo que se hicieron experimentos con ASB libre de ácidos grasos para determinar si el efecto de potenciación se debe a estos. La ASB delipidada (ASB-D) potencia la corriente T. En la figura 20 se muestra la dosis dependencia de la potenciación de I_{Ca}-T por ASB-D. La respuesta se satura alrededor de 75 μM (0.5%) de ASB-D, con una IC₅₀ aparente de 5 μM . En 36 de 39 células (92%), 75 μM de ASB-D potenció I_{Ca}-T un ~50% en promedio (rango de el 10 al 150%). A nivel poblacional la potenciación se comienza a ver a concentraciones > 2 μM ; a nivel individual, 2 de 7 células respondieron claramente a la ASB-D (potenciación $> 20\%$) a una concentración de 0.6 μM . La potenciación de I_{Ca}-T por ASB-D descarta la posibilidad de que lípidos presentes en fracciones poco puras de ASB sean los responsables del efecto. Para avanzar en el entendimiento de como es que la ASB potencia I_{Ca}-T, se comparó la potencia de la ASB-D contra la fracción V de ASB (fracción menos pura y que contiene lípidos). El razonamiento fue: si el mecanismo de potenciación de I_{Ca}-T se debe a la remoción de compuestos de la membrana plasmática que

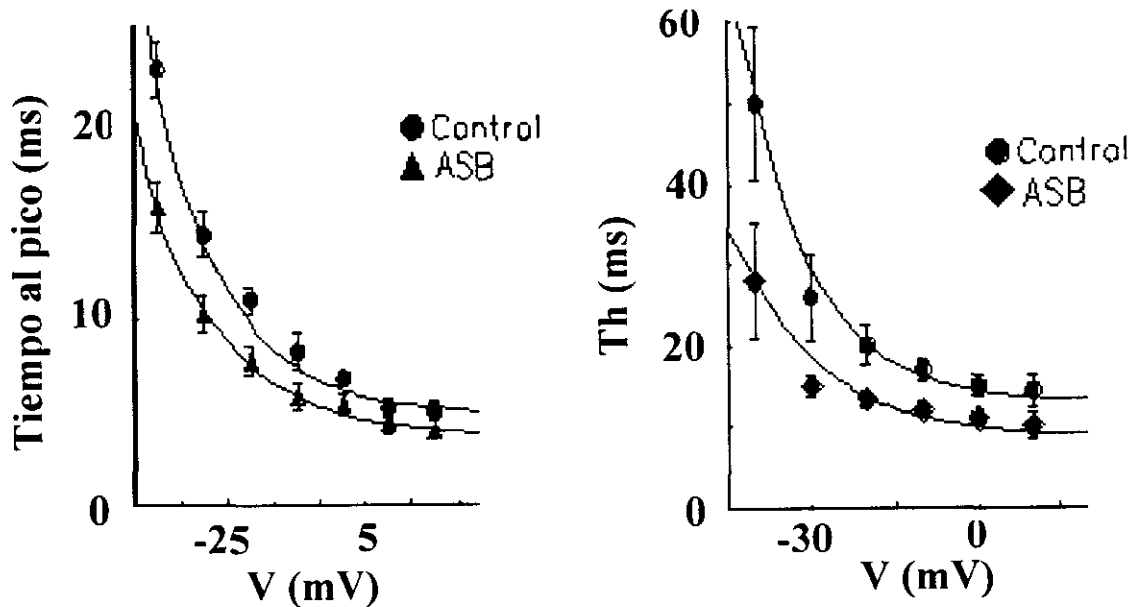
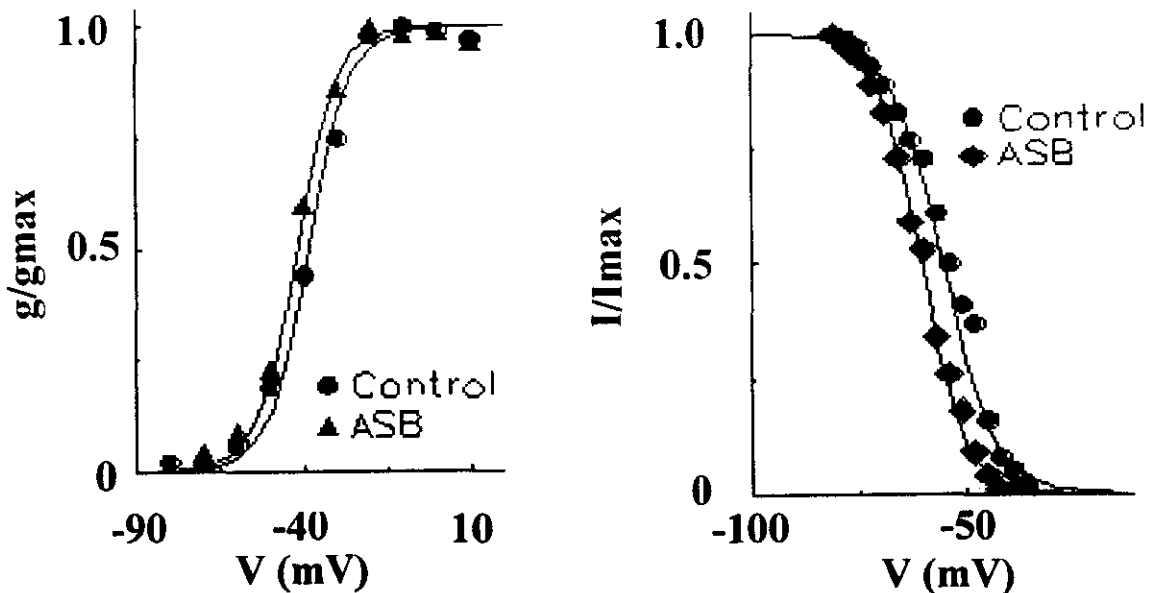
A**B**

Figura 19. Efectos de la ASB sobre la cinética y la dependencia de voltaje de I_{Ca-T} en células espermatogénicas. A) Constantes cinéticas de la activación y de la inactivación a voltajes de -40 a $+20$ mV. Los datos representan valores promedio del tiempo al pico (izquierda) y de la constante de tiempo de la inactivación (derecha) en la condición control o en presencia de ASB. Los valores obtenidos se ajustan a una exponencial. En el caso de la activación, el control presentó un cambio de e -veces cada 15.1 mV con un desplazamiento-independiente de voltaje de 4.5 ms; en presencia de albúmina estos valores fueron de 17.5 mV y de 3.6 . Para la inactivación el cambio de e -veces y el desplazamiento fueron de 11.6 mV y 13.4 ms para el control, y de 14.2 mV y 9.3 ms para la ASB. Las barras representan el ESM. B) Dependencia de voltaje de la activación y de la inactivación en estado estacionario. Los datos se ajustaron a una relación de Boltzmann. El voltaje medio de activación fue -38.5 mV para el control y de -42 mV en presencia de albúmina y las pendientes fueron de 6.2 y 6 mV. El voltaje medio de inactivación fue de -55 y -60.5 mV y las pendientes de 6 y 4.9 mV, para el control y en presencia de ASB, respectivamente.

modulen negativamente a canales iónicos, la ASB-D será más potente que la fracción V. De lo contrario, la potenciación posiblemente se deba a un efecto directo de la proteína sobre el canal o sobre algún otra molécula de membrana. Aunque la ASB-D fue ligeramente superior a la ASB fracción V (15% mas potente, no se muestra), estos resultados no permiten concluir que el efecto de la albúmina se debe a la remoción de colesterol o de algún otro compuesto hidrofóbico de la membrana.

En el espermatozoide se puede inhibir la capacitación y la fosforilación de proteínas importantes para la misma si la ASB se preincuba con sulfato de colesterol en una relación molar de 1:1 (Pablo Visconti, comunicación personal). Se piensa que esto se debe a que durante la preincubación los sitios de unión al colesterol presentes en la albúmina se saturan y, por lo tanto, en su adición posterior para capacitar, la ASB ya no secuestra el colesterol de la membrana plasmática. Utilizando un protocolo análogo al empleado para inhibir la fosforilación en tirosinas durante la capacitación, preincubamos a la albúmina en relaciones molares de 1, 5 y 10:1 (colesterol:ASB) y en ningún caso pudimos inhibir la potenciación de las corrientes T (figura

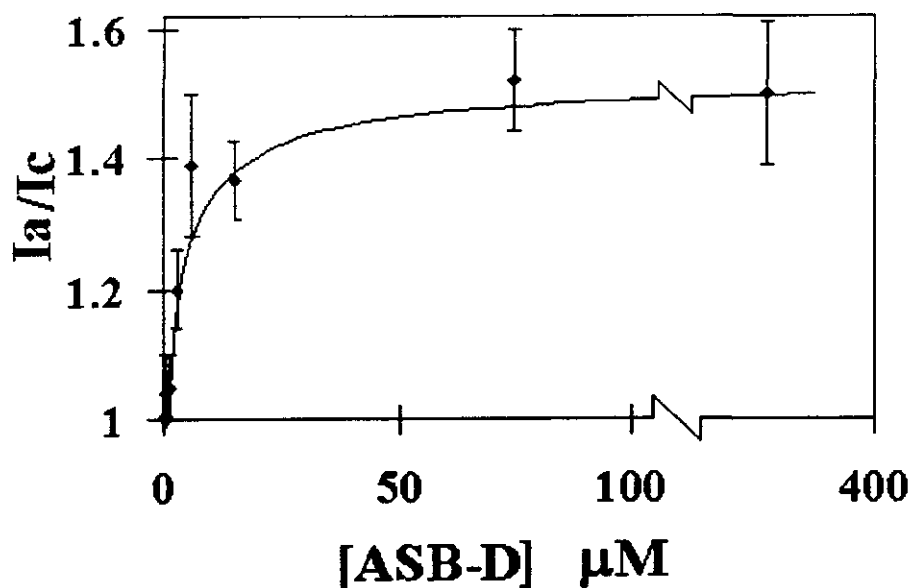


Figura 20. Dosis dependencia de la potenciación de ICa-T por ASB libre de ácidos grasos. Después de un registro control, las células se preincubaron por 2' con ASB-D y se determinó la potenciación en esta condición. La ASB-D potenció ICa-T ~ 50 % con IC50 aparente de 5 μM . Los resultados se normalizaron considerando como 1 al máximo de corriente al pico en el control. I_a = corriente al pico en presencia de ASB;

21A). De hecho, la adición subsecuente de ASB no saturada, incrementa muy poco la amplitud de la corriente en comparación con la ASB saturada, indicando que ya se estaba cerca de la saturación del efecto. De estos resultados se concluye que ASB no potencia I_{Ca-T} al secuestrar colesterol de la membrana plasmática.

Es posible que, tanto en la capacitación como en la potenciación de corrientes T, la ASB esté removiendo otro tipo de molécula hidrofóbica asociada a la membrana. Se sabe que los esteroides sexuales como la progesterona, la testosterona y el estradiol, modulan canales iónicos (Nakajima et al., 1995; Bukusoglu y Sarlak, 1996; Mermelstein et al., 1996; Takeuchi y Guggino, 1996). El estradiol modula en forma específica canales iónicos que presentan la secuencia consenso de unión al estradiol correspondiente al receptor nuclear de estrógenos

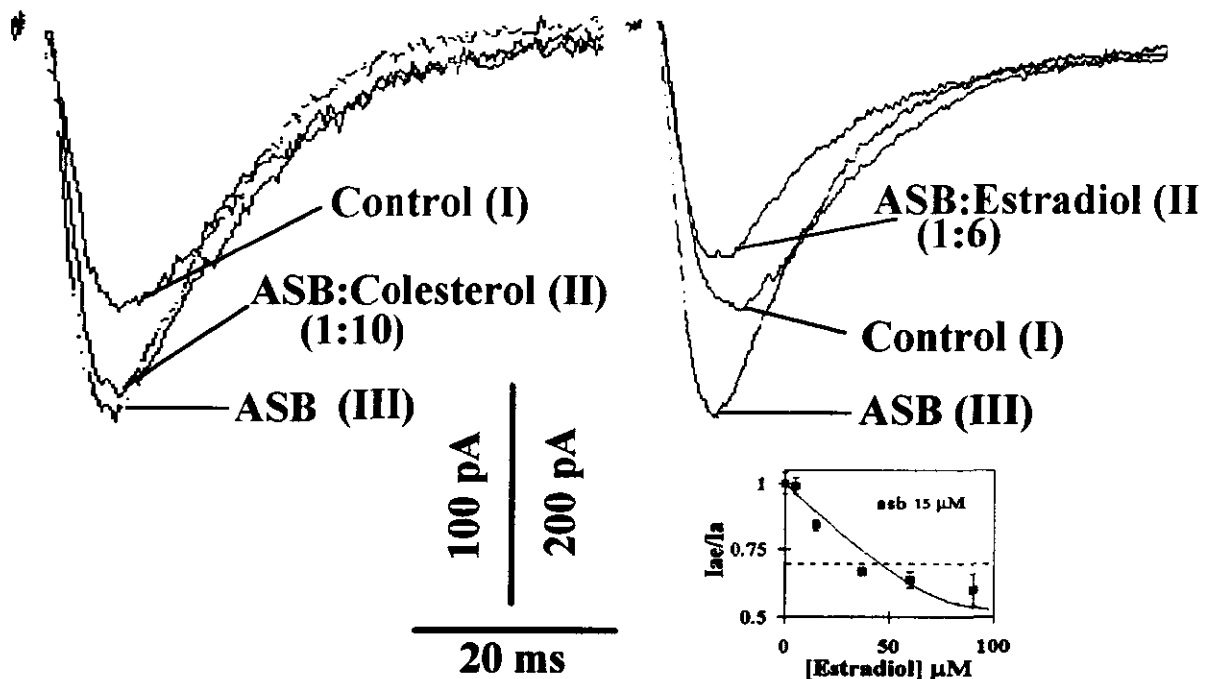


Figura 21. Efecto de la saturación de ASB con sulfato de colesterol o con 17 β -estradiol sobre la potenciación de corrientes de Ca^{2+} . La ASB (15 μM) se sonicó y preincubó por 1-2 hrs con relaciones molares de 1: 10 de sulfato de colesterol (izquierda) ó de 1:6 de 17 β -estradiol (derecha) con el objeto de saturar sus sitios de unión a estos esteroides. En ambas condiciones se muestra un trazo control, un trazo después de añadir la ASB presaturada y un trazo con ASB sin esteroide. Los números romanos indican la secuencia de las adiciones. A diferencia del sulfato de colesterol, el 17 β -estradiol inhibe tanto la potenciación por ASB como la corriente basal de I_{Ca-T}. Recuadro) Dosis dependencia de la inhibición de I_{Ca-T} por 17- β -estradiol en presencia de 0.1 % de ASB. El 17- β -estradiol inhibe la corriente control de I_{Ca-T} (----) sólo a proporciones molares ≥ 2.5 (37 μM), mientras que la potenciación la inhibe a proporciones molares inclusive $< 1:1$. I_{ae} = corriente en presencia de ASB + estradiol; I_a = corriente en presencia de ASB sin esteroide. (n=3).

(Ramón Latorre, comunicación personal) y se sabe que inhibe CCDVs vía receptores membranales en otros sistemas (Nakajima et al., 1995; Mermelstein et al., 1996; Sitzler et al., 1996), por lo que podría estar modulando ICa-T en células espermatogénicas. El efecto de la ASB puede ser entonces el de remover la modulación negativa que el estradiol ejerce sobre las corrientes T. La ASB-D se saturó preincubándola con diferentes proporciones de β -estradiol. A una relación molar $\sim 2.5:1$ (estradiol:ASB-D) se inhibe la potenciación (figura 21B, recuadro). Aunque estos resultados coinciden con la hipótesis de remoción del estradiol de algún receptor membranal, otra posibilidad es que el estradiol esté inhibiendo ICa-T independientemente de la potenciación por ASB-D. El comportamiento final resulta de una sumatoria de ambos procesos. De acuerdo con esto, la figura 21 (B, recuadro) muestra la inhibición de ICa-T por estradiol cuando está presente en un exceso molar ≥ 2.5 con respecto a la ASB-D.

Los resultados anteriores, no permiten concluir si el efecto de potenciación de ICa-T por ASB involucra la remoción de β -estradiol, ni si un mecanismo similar opera durante la fosforilación de proteínas en el proceso de capacitación. Para confirmar o descartar estas hipótesis, se determinó el efecto de la ovoalbúmina sobre ICa-T y, en colaboración con Pablo Visconti de la Universidad de Pensilvania, se determinó el efecto del 17β -estradiol sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación del espermatozoide. La remoción del colesterol durante el proceso de capacitación es específico de moléculas que unen este esteroide. Por ejemplo, las lipoproteínas de alta densidad y la ciclodextrina mimetizan los efectos de la ASB sobre el contenido de colesterol de la membrana del espermatozoide y la fosforilación en tirosinas (Pablo Visconti, comunicación personal). En contraste, moléculas que no unen colesterol como la ovoalbúmina, no mimetizan el efecto de la ASB en la capacitación. Para ahondar sobre la especificidad de ASB en la potenciación de ICa-T, se utilizó ovoalbúmina a concentración de $75 \mu\text{M}$. A diferencia de su carencia de efecto en la fosforilación en tirosinas, la ovoalbúmina incrementa ICa-T en células espermatogénicas, aunque con una potencia menor que la ASB-D (figura 22A). En los experimentos de capacitación en presencia de estradiol, los espermatozoides se incubaron con 0.3% de ASB-D saturada (se usaron relaciones molares de 0.02 , 0.2 y 2 de 17β -estradiol:ASB-D). El β -estradiol no sólo no inhibe la fosforilación de tirosinas durante la capacitación (figura 21B) como sucede cuando se satura la ASB-D con colesterol en relación molar de $1:1$ (colesterol:ASB-D), sino que por el contrario, aumentan los

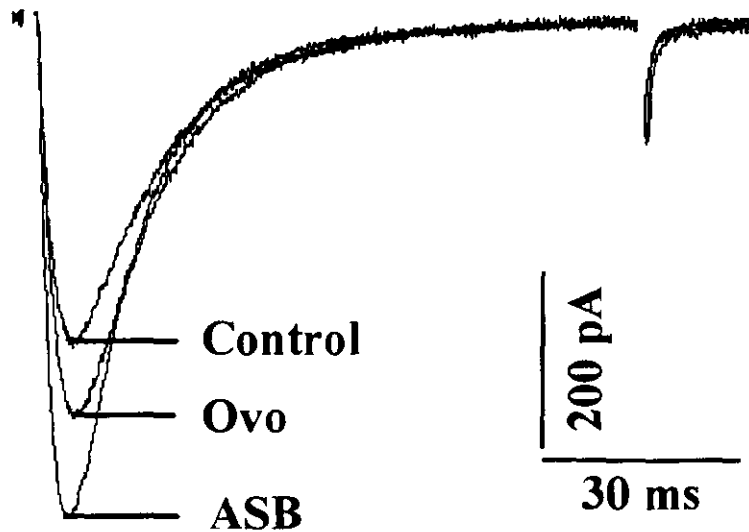
A**B**

Figura 22. Efecto de la ovoalbúmina sobre la ICa-T de células espermatogénicas y del estradiol en la fosforilación en tirosinas durante la capacitación. A) Trazos a -20 mV en ausencia (control) o en presencia de ovoalbúmina o después de su lavado con ASB. La ovoalbúmina potencia ICa-T alrededor de un 40 % con respecto al efecto observado con la adición posterior de ASB (misma concentración). La célula se preincubó 2 minutos en presencia de cada una de las soluciones proteicas. B) Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación. Las células se preincubaron en condiciones capacitantes (10 mM de HCO_3^- , 0.3% de ASB) durante los tiempos señalados en ausencia (0) o en presencia de 1, 10 y 100 μM de 17 β -estradiol. Al contrario de lo esperado, el estradiol potencia la fosforilación en tirosinas. C- corresponde al control negativo en ausencia de ASB y HCO_3^- .

niveles de fosforilación. En conjunto, estos datos sugieren que el mecanismo de potenciación ICa-T con ASB difiere del que se da durante la capacitación del espermatozoide en presencia de esta proteína. En la siguiente sección se discuten otros posibles mecanismos por los que ASB podría potenciar a ICa-T.

IV. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el de caracterizar canales iónicos del espermatozoide de mamífero por la técnica de patch-clamp. Debido a su pequeño tamaño y a su morfología alargada y plana, resultó muy difícil el estudio electrofisiológico de corrientes iónicas por esta técnica en el espermatozoide de ratón como metodología de rutina. Se utilizaron también metodologías como el estudio fluorométrico del potencial de membrana y el estudio electrofisiológico de canales de Ca^{2+} de células espermátogénicas que, según evidencias farmacológicas, se piensa que también están en el espermatozoide jugando un papel importante en su fisiología. Se discuten hallazgos relevantes en la literatura, con el objeto de presentar un panorama integrado de la opinión actual en relación al papel de los flujos iónicos en la fisiología del espermatozoide.

IV.1 Canales catiónicos del espermatozoide y cambios en el potencial de membrana y en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la RA.

En este trabajo se registraron dos tipos de transiciones catiónicas. La primera, corresponde a un canal catiónico rápido permeable a monovalentes y la segunda a un canal catiónico lento que permite el flujo de Ca^{2+} . Por la técnica de bicapas se han registrado canales del espermatozoide con propiedades cinéticas y de permeabilidad parecidas, tanto en el erizo de mar (Liévano et al., 1990; Beltrán et al., 1994; Labarca et al., 1996) como en el mamífero (Beltrán et al., 1994; Labarca et al., 1995). Ambas permeabilidades son pobremente selectivas (ver resultados) por lo que al activarse depolarizarían al espermatozoide.

La depolarización inducida por ZP (Arnoult et al., 1996a) o por progesterona (Foresta et al., 1993, 1995), presenta una dependencia iónica compleja. La sustitución de Na^+ indica que este es el ión que interviene mayormente en la depolarización. Foresta et al. (1993), concluyen que en esta depolarización participa un canal catiónico pobremente selectivo que es permeable, al NH_4^+ , y a la N-metil-D-glucamina. Posiblemente la interpretación de estos investigadores en relación a la permeabilidad a los cationes orgánicos sea errónea ya que: 1) se ha demostrado que durante la depolarización inducida por la progesterona hay un eflujo de Cl^- a través de canales activados por

ligando (Meléndrez y Meizel, 1995; Sabeur et al., 1996; ver abajo); 2) durante la RA inducida con ZP, la sustitución de Ca^{2+} e inclusive de Cl^- , también inhiben parte de la depolarización (Arnoult et al., 1996a; y 3) estos estudios se hicieron con fluoróforos sensibles al potencial de membrana (lo cual no permite discernir el tipo de iones que están fluyendo a través de la membrana), por lo tanto, al haber permeabilidad simultánea a diferentes iones y por distintas vías, la depolarización nunca se eliminará por completo independientemente del ión que se sustituya.

Se propone que durante la RA inducida por ZP, la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se lleva a cabo por dos vías de permeabilidad (Florman, 1994). Esta hipótesis es análoga a la propuesta para el espermatozoide de erizo de mar (Guerrero y Darszon, 1987). Uno de los canales de Ca^{2+} permite una entrada rápida y transiente de Ca^{2+} y es sensible a dihidropiridinas (Darszon et al., 1998). En mamíferos, este canal podría ser del tipo T (Liévano et al., 1996; Arnoult et al., 1996b; Santi et al., 1996). El otro canal de Ca^{2+} , es pobremente selectivo, permite una entrada sostenida de Ca^{2+} , y posiblemente sea sensible al pH_i y a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este canal comparte características con canales del espermatozoide registrados en bicapas (Beltrán et al., 1994; Labarca et al., 1995), con un canal de Ca^{2+} sensible al pH en células espermatogénicas (Santi et al., 1998) y podría corresponder al canal catiónico lento registrado en este trabajo.

La depolarización inducida por la progesterona esta asociada a una elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de PKC (Foresta et al., 1995). Se propone que la depolarización se debe principalmente al influjo de Na^+ ya que el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero no la depolarización, es inhibido por estaurosporina (inhibidor de PKC). Estos resultados sugieren que hay una vía responsable de la entrada de Ca^{2+} que es modulada por PKC y otra vía responsable de la entrada de Na^+ independiente de esta cinasa.

IV.2. Inhibición de flujos aniónicos y de la RA.

IV.2.1. Efecto del GABA y de bloqueadores de canales de Cl^- sobre la hti-Ca.

Anteriormente (Espinosa y Darszon, 1995) demostramos que el ácido niflúmico inhibe alrededor de un 40 % la hti-Ca con una $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$. En ese entonces, resultados preliminares sugerían también que a concentraciones menores ($\sim 10 \mu\text{M}$) el AN potencia hti-Ca. Aquellos

estudios se realizaron en un medio de capacitación conocido como HMB. Para este trabajo, tanto los estudios de potencial de membrana como de RA, se hicieron en un medio de capacitación comercial (M-199) suplementado con 0.4% de albúmina y 10 mM de bicarbonato. Como control, *determinamos nuevamente la IC50 del AN por un lado, y por otro lado, determinamos el efecto de concentraciones submicromolares de este fármaco (y del GABA) sobre la hti-Ca.* Además, con objeto de fortalecer la hipótesis de la participación de flujos aniónicos sobre la hti-Ca, utilizamos otros bloqueadores de canales de Cl⁻. En la figura 12 se muestra el efecto inhibitorio del AN y del DDF sobre la hti-Ca. De esta figura llaman la atención tres cosas: (1) la IC50 para el AN (100 μM) es menor que la reportada anteriormente, (2) el DDF es más potente que el AN (IC50 = 1 μM) y, (3) el DDF inhibe hasta un 100% a 100 μM. Pensamos que las diferencias en el efecto inhibitorio del AN sobre la hti-Ca entre este trabajo y las reportadas en Espinosa y Darszon (1995), se pueden deber a las diferencias en el medio utilizado. La presencia de ácido glutámico y del rojo fenol en el medio M-199 y no en el HMB, pueden explicar en parte el desplazamiento en la sensibilidad al AN. Se sabe que en la membrana del espermatozoide está presente la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Persson et al., 1990) que podría estar descarboxilando al ácido glutámico del medio convirtiéndolo en GABA y, como veremos a continuación, el GABA parece incrementar la sensibilidad de la hti-Ca al AN. Se sabe también que en presencia de fenol aumenta la sensibilidad de la ciclooxygenasa a los fenamatos (Egan et al., 1978). Se cree que esto se debe a que el fenol modifica el sitio de unión de los fenamatos, lo cual podría estar sucediendo también en el canal aniónico que participa en la hti-Ca. Por otro lado, no esperábamos que un bloqueador de canales aniónicos como el DDF inhibiera la hti-Ca en un 100%. Primero, porque la ouabaína inhibió alrededor del 70% de la hti-Ca (Espinosa y Darszon, 1995), sugiriendo también la participación de la ATPasa Na⁺/K⁺ en este evento. Y también porque, ni con la combinación de AN y ouabaína, hubo una inhibición mayor al 85%. Una posibilidad es que el DDF inhiba una entrada de Na⁺ necesaria para que se de el fenómeno de hti-Ca (ver antecedentes y figura 8). Así lo sugieren resultados preliminares donde en combinación con el desacoplante CCCP, 100 μM de DDF mimetizan el efecto del Ca²⁺ tal como se ha observado para algunos cationes divalentes que inhiben la hti-Ca (figura 4a en Espinosa y Darszon, 1995). En el modelo que proponemos (figura 8C), el Na⁺ permea por una vía sensible a concentraciones micromolares de Ca²⁺ externo, en presencia del divalente, la permeabilidad aumentada al Na⁺ se pierde. Pensamos que esa vía puede

ser un canal de Na^+ o un canal de Ca^{2+} . Ya que 100 μM de DDF bloquea $\sim 90\%$ de la corriente de Ca^{2+} tipo T de células espermatozóicas (figura 17), es factible que este canal permita el influjo del Na^+ al espermatozoide en medios depletados de Ca^{2+} .

Además del AN y del DDF, resultados preliminares indican que una gama de otros bloqueadores de flujos aniónicos como el NPPB y el dipiradimol también inhiben en forma importante la hti-Ca. Se sabe que los flujos de Cl^- sensibles a estos compuestos pueden estar asociados a los flujos de algún catión como el Na^+ o el K^+ , y que en conjunto pueden participar en la regulación osmótica de las células (Brochiero et al., 1995; Hall et al., 1996; Kanli y Norderhus, 1998). Los flujos iónicos durante la regulación osmótica se pueden llevar a cabo a través de canales iónicos, la bomba de Na^+/K^+ y transportadores de aminoácidos que participan en la neurotransmisión (v.gr. GABA, serotonina) (Kanner, 1994; Sonders y Amara, 1995). En el espermatozoide de mamífero ha sido demostrada la presencia del transportador GAT1 (transportador de GABA, Aanesen et al., 1996). No sabemos si un fenómeno de regulación osmótica opera durante la hti-Ca, pero el efecto de la ouabaina y de los bloqueadores aniónicos sobre la hti-Ca así lo sugieren. Otra posible explicación para la inhibición total de hti-Ca por el DDF es que el canal aniónico afectado por este fármaco esté íntimamente relacionado con otras permeabilidades membranales. Como los flujos de los diferentes iones que participan en la regulación osmótica son interdependientes, el DDF podría ejercer un 100% de inhibición al bloquear totalmente un canal de Cl^- .

Los resultados muestran también que el GABA y el AN modulan a la hti-Ca (Figura 13). Bajas concentraciones de GABA ($\sim 4 \mu\text{M}$) potencian la hti-Ca alrededor del 50 %. Igualmente bajas concentraciones de AN estimulan la hti-Ca. Es interesante que sólo a concentraciones $> 2.5 \mu\text{M}$, el AN inhibe la hti-Ca. Cuando ambos moduladores se usaron en forma combinada, el bloqueo por el AN fue mayor. En estos experimentos, se fue variando la concentración de GABA a una misma concentración de AN, como se observa en la (Figura 13). En presencia de 200 μM de GABA, la sensibilidad al AN fue ~ 20 veces mayor a la que mostró en ausencia del agonista. Estos resultados son similares a los reportados en estudios electrofisiológicos sobre canales de Cl^- expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* en donde se estudio el efecto del AN y otros fenamatos (antiinflamatorios no esteroideos), como el ácido flufenámico y el mefenámico, sobre un R-GABA_A neuronal. Estos fármacos muestran efectos bimodales sobre dichos canales

dependiendo de la concentración del GABA. A bajas concentraciones de GABA los fenamatos potencian el efecto del GABA en la activación del R-GABA_A y a concentraciones altas de GABA los fenamatos inhiben la corriente (Woodward *et al.*; 1994). Unas de las posibles explicaciones de los efectos bimodales son:

- Diferentes tipos de R-GABA_A (Woodward *et al.*; 1994) ó de sitios de unión con diferentes afinidades y efectos. Un canal (o sitio de unión) de alta afinidad por el GABA al cual estimula, y otros canales (o sitios) poco afines al GABA que se inhiben a concentraciones mayores.

- Se sabe que los fenamatos además de afectar a otros tipos de canales iónicos pueden afectar el metabolismo del ácido araquidónico cuyos metabolitos pueden inhibir el R-GABA_A (Rabow *et al.*; 1995). A bajas concentraciones los fenamatos inhibirían niveles basales de metabolitos del ácido araquidónico provocando una potenciación indirecta del R-GABA_A. A concentraciones elevadas los fenamatos podrían bloquear directamente al canal.

El estudio de los flujos iónicos por técnicas electrofisiológicas directas como el patch clamp son muy difíciles de ser ejecutadas en el espermatozoide por su pequeño tamaño (~ 4 µm). Por ello, aunque la hti-Ca no es un fenómeno fisiológico, la información generada a través de su estudio demuestra que es buen modelo para la caracterización de moléculas permeables a iones que podrían participar en la RA o en otros eventos fisiológicos del espermatozoide.

IV.2.2 Corrientes aniónicas unitarias en el espermatozoide.

El canal aniónico registrado en este trabajo, presenta varios subestados de conductancia, así como rectificación saliente y una voltaje dependencia importante. Anteriormente habían sido registrados, usando la técnica de bicapas planas, canales de Cl⁻ tanto del erizo de mar (Morales *et al.*, 1993), como del espermatozoide de ratón (Labarca *et al.*, 1995). En ambos casos los canales muestran una P_o muy alta (~0.9). Además, la conductancia unitaria del canal iónico del espermatozoide de ratón reconstituido en bicapas es similar (~ 85 pS) a la observada para el canal aniónico registrado por patch-clamp a + 80 mV. Si bien estas son semejanzas importantes, los canales aniónicos registrados en bicapas planas no mostraron rectificación ni la dependencia de voltaje observadas en este trabajo. Cabe la posibilidad de que los registros en bicapas y por

patch-clamp, correspondan a canales aniónicos análogos. En este caso las diferencias pueden deberse a disimilitudes en las condiciones experimentales. Por ejemplo, la rectificación y la voltaje dependencia observadas en este trabajo, pueden resultar de un bloqueo dependiente de voltaje por la presencia de F^- en la pipeta. Además, los canales registrados en bicapas planas están en un ambiente lipídico no nativo y en ausencia de la influencia de factores intracelulares, por lo que su comportamiento no necesariamente es igual al que presentarían en la célula completa.

Los canales aniónicos R-GABA_A (en humano y ratón) y el R-Glicina (en cerdo) están involucrados en la RA de esas especies (Wistrom y Meizel, 1993; Roldán et al., 1994; Meléndrez y Meizel, 1996). Además, el efecto del AN y del GABA sobre hti-Ca sugieren también la presencia del R-GABA_A en el espermatozoide y su participación en este proceso. Fármacos de la familia de los progestágenos potencian la respuesta del R-GABA_A neuronal al GABA (Wehling, 1997). En contraste en el espermatozoide de mamífero, la progesterona activa al canal en ausencia del GABA, sugiriendo la presencia de una isoforma del R-GABA_A particular del espermatozoide (Wistrom y Meizel, 1993). El canal aniónico registrado en el erizo de mar tiene selectividad análoga al R-GABA_A. Aunque no se puede hablar de un estudio de selectividad con el canal aniónico en este trabajo, de ser cierta la hipótesis de bloqueo por F^- , coincidiría también con propiedades del R-GABA_A. Por otro lado, Siegel et al. (1989), reportaron la expresión de un R-GABA_A, homopentámero a subunidades β , que se abre aún en ausencia del agonista. No sabemos la identidad del canal aniónico registrado por patch-clamp en el espermatozoide de ratón. Si bien hay varias similitudes en los resultados obtenidos en este trabajo y las propiedades del R-GABA_A (sensibilidad al AN de la RA inducida con GABA y de este canal, subestados de conductancia y "selectividad iónica") se requiere de mayor investigación para determinar si el canal aniónico registrado por patch-clamp es de la familia del R-GABA_A o de algún otro tipo.

IV.2.3 Inhibición de la RA.

Se considera que la ZP3 (glicoproteína de la ZP) es el inductor fisiológico de la RA. Sin embargo, la RA *in vitro* también se puede inducir con GABA o con progesterona. Aunque se desconoce el papel fisiológico de éstos dos últimos inductores de la RA, se sabe que la progesterona es secretada por las células foliculares que rodean al óvulo (revisado en Meizel, 1997). En relación al GABA, está presente en el tejido del oviducto en los mamíferos y puede

ser secretado por dicho tejido hacia el lumen uterino. Además, aunque se desconocen los niveles de GABA en la zona de fecundación, el R-GABA_A ha sido inmunolocalizado en la membrana plasmática tanto de las células del cumulus como del espermatozoide mismo (Wistrom y Meizel, 1993), por lo que se ha considerado la posibilidad de que tanto el GABA como la progesterona pueden estar participando en la RA *in vivo*.

En relación a los flujos iónicos en el espermatozoide de mamífero, durante la RA inducida tanto con ZP como con progesterona, hay un rápido incremento de [Ca²⁺]_i (Florman *et al*; 1989; Blackmore *et al.*, 1990, 1991a,b; Fraser, 1992; Arnoult *et al*; 1996a), además de un flujo de Cl⁻ (Wistrom y Meizel, 1993; Meléndrez y Meizel, 1996, Sabeur *et al.*, 1996). Actualmente se desconoce si en la RA inducida con GABA hay incremento de la [Ca²⁺]_i. Hay evidencias sugiriendo que durante la RA inducida con progesterona o con GABA en el espermatozoide de humano y de ratón, está participando el R-GABA_A, permitiendo un flujo de Cl⁻. La RA se inhibe al utilizar picrotoxina y bicuculina, antagonistas del R-GABA_A, o al sustituir el Cl⁻ externo por un anión no permeante (Wistrom y Meizel; 1993; Roldán *et al*; 1994; Shi y Roldán; 1995). Además, en espermatozoides de humano y cerdo, se reportó la participación de otro canal de Cl⁻ activado por ligando en la RA inducida con ZP, el receptor de glicina (R-Gli, ver abajo) (Meléndrez y Meizel, 1996).

El AN, el DDF y el NPPB inhiben, entre otros, corrientes de Cl⁻ activadas por Ca²⁺, canales de Cl⁻ que participan en osmoregulación y corrientes de Cl⁻ del R-GABA_A neuronal (White y Aylwin, 1990; Baron *et al.*, 1991; Walsh and Wang, 1993; Woodward *et al*; 1994). En este trabajo examinamos el efecto de estos fármacos sobre la RA inducida con GABA, progesterona o ZP. Además, el AN inhibe la RA con diferente sensibilidad para cada uno de los ligandos. La RA es más sensible al AN cuando se induce con ZP y con GABA (~ IC₅₀ de 1 μM y 7 μM, respectivamente). En cambio, cuando se induce con progesterona la IC₅₀ es ~ 80 y 10 veces mayor que para los otros ligandos (85 μM). Esto era inesperado ya que la hipótesis propuesta por Wistrom y Meizel., (1993) es que la progesterona induce la RA al potenciar al R-GABA_A como ha sido observado en otros sistemas (Macdonald, 1995; Rabow, 1995; Wehling, 1997). Este resultado podría indicar que participan diferentes canales de Cl⁻ en la RA inducida con los distintos agonistas. No se descartan otras posibles explicaciones. Por ejemplo, se sabe que esteroides como la dihidroprogesterona y la tetrahidroprogesterona pueden inhibir

alostéricamente la unión de TBPS (antagonista) del R-GABA_A neuronal; el muscimol y otros agonistas como las benzodiazepinas disminuyen también la afinidad del R-GABA_A hacia diferentes agentes generadores de estados convulsivos (Rabow, 1995; Majewska, 1990). Posiblemente la progesterona ejerce un efecto similar, al disminuir la afinidad de su receptor por el AN. Esto a su vez, explicaría porqué la RA inducida con progesterona es menos sensible al AN que la inducida con GABA o ZP (figura 16A). Así mismo, el NPPB y el DDF bloquean la RA (figura 16 B,C). Las afinidades de la inhibición de la RA inducida con ZP, progesterona y GABA para el NPPB fueron de 1, 11 y 1 μ M, respectivamente. La inhibición de la RA inducida con ZP o con progesterona fue de ~ 50 % con 1 μ M del DDF. Pensamos que el blanco de estos inhibidores es un canal aniónico (posiblemente el R-GABA_A). Por otro lado, se sabe que estos compuestos también inhiben corrientes de canales catiónicos, entre ellos los CCDVs (Walsh y Wang, 1993; Doughty et al., 1998). Por ello, se consideró importante determinar el efecto de estos fármacos sobre canales catiónicos que puedan estar participando en la RA. Como se mencionó anteriormente, los estudios farmacológicos de los canales de Ca²⁺ tipo T registrados en células espermatogénicas sugieren su presencia en el espermatozoide maduro y su participación en la RA (Santi et al., y Arnoult et al., 1996), por lo que se consideró un buen modelo para probar los bloqueadores de canales aniónicos. El DDF y el AN inhibieron las corrientes T con IC50s de 28 y 43 μ M. En contraste, el comportamiento de la inhibición por NPPB, sugiere la presencia de 2 sitios de unión con afinidades de ~ 35 nM y 75 μ M. En conjunto estos resultados sugieren que el espermatozoide tiene más de un tipo de canal iónico sensible a estos fármacos y que, a excepción del sitio de alta afinidad para el NPPB, la inhibición de la RA por estos compuestos se debe principalmente a su acción sobre un canal aniónico y no sobre el canal de Ca²⁺ tipo T.

¿Qué papel juega el flujo de Cl⁻ durante la RA? Pensamos que el efecto de los flujos de Cl⁻ sobre la RA se deben esencialmente a su influencia sobre el potencial de membrana del espermatozoide. Clásicamente, se considera que la activación del R-GABA_A neuronal produce un efecto inhibitorio al hiperpolarizar la membrana debido al influjo de Cl⁻ a la célula. (Dunn et al., 1994; Macdonald y Olsen, 1994, Djamgoz, 1995; Rabow et al., 1995). Nuestros experimentos de hti-Ca sugieren que, en efecto, el potencial de inversión del Cl⁻ podría estar favoreciendo su influjo y la hiperpolarización del espermatozoide. Cabe recordar que los espermatozoides capacitados tienen un potencial de reposo de alrededor de -60 mV (Zeng et al., 1995), potencial

al cual un número superior al 80% de canales tipo T están inactivados (Santi et al., 1996). De estar operando este modelo, la apertura del R-GABA_A provocaría una hiperpolarización transitoria y la remoción efectiva de la inactivación de canales de Ca²⁺ tipo T. Esto a su vez, permitiría una elevación transitoria de Ca²⁺ a la célula. Esta hipótesis es análoga a la propuesta en la RA del erizo de mar. El inductor de la RA en esta especie, activa una hiperpolarización transitoria dependiente de K⁺ (González-Martínez et al., 1987) que a su vez es necesaria para activar la alcalinización citoplásmica y una depolarización dependiente de Na⁺ y de Ca²⁺. En contraste, los estudios de RA con progesterona en el espermatozoide de humano, indican que el Cl⁻ sale de la célula y, por lo tanto, este eflujo depolariza la membrana (Sabeur et al., 1996). En neuronas no diferenciadas la apertura del R-GABA_A induce una depolarización (Matt y Lewis, 1994; Obrietan y van de Pol 1995; Obrietan et al., 1996), seguida del incremento de la [Ca²⁺]_i a través de CCDVs. Algo similar podría estar operando en el espermatozoide, el GABA induciría una depolarización vía el R-GABA_A, la cual a su vez provocaría la apertura del canal tipo T. A diferencia de la hipótesis anterior (influjo de Cl⁻ hiperpolarizante), en este caso gran parte de los canales T estarían inactivados de inicio lo que podría parecer desventajoso. Esto no necesariamente es así si consideramos que, dentro de los modelos de los flujos iónicos durante la RA, se ha propuesto que varias vías de permeabilidad, que se cree que se abren secuencialmente, participan en los incrementos de la [Ca²⁺]_i. Además, se piensa que estas vías están intercomunicadas (posiblemente mediante incrementos transitorios de Ca²⁺_i (Florman, 1994; Breitbart y Spungin., 1996; Darszon et al., 1998)). En este sentido, la apertura de los pocos canales tipo T no inactivados permitiría un incremento de Ca²⁺_i que, aunque pequeño, fuera suficiente para activar otras permeabilidades al Ca²⁺. Este modelo coincide con la observación tanto de incrementos transitorios como sostenidos en poblaciones de espermatozoides en suspensión (Bonnacorssi, 1995) o en células únicas (Florman et al., 1994). Entre las otras vías permeables al Ca²⁺ propuestas están un canal de Ca²⁺ pobremente selectivo (Florman, 1994; Santi et al., 1998) y el receptor a IP3 (Walensky y Snyder, 1995; Spungin y Breitbart, 1995) que, en ambos casos, su activación se vería favorecida al alcalinizarse el pH durante la RA.

IV.3 Modulación de Corrientes T por Albúmina.

IV.3.1 Cambios en propiedades biofísicas de I_{Ca-T}, inducidos por ASB. La ASB, potencia las I_{Ca-T} de células espermatozógenas. I_{Ca-T} se incrementa hasta un 150% con una EC₅₀ de ~5 μ M. A diferencia de otros CCDVs, los canales de Ca²⁺ tipo T muestran una fuerte influencia del voltaje aplicado sobre las cinéticas de activación e inactivación. La caracterización biofísica de la potenciación indica que ASB modifica la dependencia de voltaje y la cinética de estas corrientes. Los cambios en la dependencia de voltaje pueden resultar, por si solos, en cambios aparentes en la cinética. En el caso de la potenciación de corrientes T por ASB, los corrimientos en la dependencia del voltaje deberían ser de alrededor de a 10 mV (y no de 3 y 5 mV) para dar cuenta de los cambios cinéticos. Por ejemplo, en la figura 19 A, se observa como el tiempo al pico de la corriente máxima a -20 mV (7.7 ms) en la presencia de ASB, es menor que para un voltaje aplicado de -20 o -10 mV (11 y 8.2 ms, respectivamente) en la condición control. El desplazamiento en la dependencia de voltaje de ~3 mV contribuiría tan sólo con una disminución de ~1 ms en el tiempo al pico, por lo que a un voltaje de -20 mV el tiempo al pico debería ser de 10 ms en la presencia de ASB. Además, tanto para la activación como para la inactivación, se observa un desplazamiento en el tiempo mínimo al pico independiente de voltaje, donde las constantes de tiempo para la activación y la inactivación son menores en presencia de ASB. Lo anterior confirma que la adición de ASB modifica tanto los parámetros cinéticos como la dependencia de voltaje. Por otro lado, las constantes cinéticas y la dependencia de voltaje de la inactivación se ven mayormente afectadas por ASB que los mismos parámetros para la activación. Esto sugiere que el incremento en I_{Ca-T} en presencia de ASB no se debe a los cambios en dichos parámetros. Existen entonces dos posibilidades para que las corrientes se incrementen en presencia de ASB: 1) un aumento en el número de canales activables y/o 2) un incremento en la corriente unitaria de los canales. Santi et al. (1996), estudiaron la recuperación de la inactivación de estas corrientes. Señalan que la cinética de la recuperación es dependiente de voltaje y que presenta dos componentes, uno de ~400 ms (a -80 mV de potencial aplicado durante el tiempo interestímulo) y otro más lento que no determinaron pero que parece estar en el orden de segundos. Este componente contribuye con alrededor del 20% del proceso de recuperación. La ASB podría estar anulando el componente lento o disminuyendo las constantes de ambos,

participando en parte de la potenciación. En acuerdo con esto, experimentos preliminares recientes en los que se aplica un prepulso (4 s de duración) cada vez más negativo (-80 a -140 mV) entre pulso y pulso, indican que la amplitud de la corriente continúa aumentando entre más negativo sea el prepulso hasta un voltaje de alrededor de -130 mV. Posiblemente las células espermatogénicas tengan una población silente de canales que requieren de un voltaje muy negativo (o de regulación similar a la ejercida por la ASB), para salir de su inactivación. En relación a la conductancia unitaria de los canales, una de las diferencias entre las propiedades de los canales T y otros CCDVs es que, los primeros, tienen una menor conductancia unitaria (~7-10 pS) que los segundos (> 14 pS). Meier y Dolphin (1998), reportan 2 subestados de conductancia para subunidades $\alpha 1B$, C y E cuando son expresadas en ausencia de subunidades accesorias. El nivel menor de conductancia corresponde al esperado para canales T. En las células espermatogénicas de ratón, las evidencias experimentales sugirieron inicialmente la presencia de CCDVs correspondientes al $\alpha 1E$ (Liévano et al., 1996), y más recientemente al $\alpha 1C$ y $\alpha 1G$ (Carmen Serrano y Claudia Treviño, no publicado). En este contexto, el aumento en la conductancia unitaria se debería a un cambio de subestado de conductancia. Evidentemente, el aumento de la conductancia unitaria bajo el efecto de la ASB explicaría por sí sola la potenciación de los canales T. Se requerirá hacer registro de canales unitarios para ahondar sobre esta hipótesis.

IV.3.2 Posibles mecanismos de modulación de I_{Ca}-T por ASB. ¿Cómo es que ASB modula I_{Ca}-T? Se ha reportado que la albúmina sérica modula a corrientes de Ca^{2+} tipo T registradas por la técnica de patch-clamp (Chiang et al., 1993; Schmitt y Meves, 1994) y al receptor de rianodina estudiado en bicapas planas (Lu et al., 1994; Catinot et al., 1997), en otros tipos celulares. Uno de los mecanismos por los que se piensa que la ASB pudiera estar potenciando I_{Ca}-T, es mediante su interacción con moléculas hidrofóbicas que modulen a canales iónicos. El colesterol, la vitamina-D y los esteroides sexuales, tienen una estructura muy parecida. De hecho todos se derivan de un mismo compuesto, el colesteno (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Clásicamente se considera que los esteroides actúan a nivel nuclear regulando la transcripción, pero recientemente se ha reconocido que también son moduladores de canales iónicos actuando sobre receptores de la membrana plasmática (revisado en: Wehling, 1997). La albúmina adsorbe

eficientemente a estos compuestos. El efecto potenciador de la ASB puede deberse a la remoción de moduladores negativos de canales iónicos. En este trabajo el efecto de ASB sobre ICa-T se estudió para determinar si ocurría a través de la remoción de colesterol en células espermatogénicas y si este efecto pudiera formar parte del mecanismo por el cual ASB modula la fosforilación en tirosinas durante la capacitación. Los resultados que obtuvimos indican que el efecto de ASB sobre ICa-T y sobre la fosforilación de tirosinas, no implican el mismo mecanismo. Esta conclusión se deriva de cuatro hallazgos: 1) el efecto de potenciación de ICa-T en células espermatogénicas se lleva a cabo en un lapso $< 1/10$ del tiempo requerido para la capacitación (2-5 min. vs 30-90 min.), 2) el sulfato de colesterol no satura el efecto de ASB en ICa-T como se observa en la fosforilación de tirosinas (Visconti et al., 1998), 3) la ovoalbúmina (la cual no une colesterol) potencia ICa-T pero no tiene efecto en la capacitación (Visconti et al., 1998) y 4) el 17 β -estradiol inhibe ICa-T y su potenciación por ASB, pero no inhibe la fosforilación en tirosinas.

La albúmina presenta dos cavidades hidrofóbicas que además de los esteroides, unen una amplia diversidad de compuestos como ácidos grasos, aminoácidos y fármacos (Chen, 1967; He y Carter, 1992). La modulación de los canales iónicos puede ser positiva o negativa y depende tanto del compuesto como del sistema en el que se está probando. Es decir, un mismo compuesto (v.gr. ácido araquidónico) puede ser inhibitorio (Schmitt y Meves, 1994) o potenciador (Kim, 1992; Damron y Bond, 1993) de flujos iónicos. Muchas de las fracciones comerciales de ASB comúnmente utilizadas en experimentación contienen gran cantidad de lípidos (Chen, 1966, Chiang et al., 1993). Por lo tanto, el efecto potenciador de ASB puede deberse no a la remoción membranar de moléculas que modulan negativamente al canal tipo T de manera "constitutiva", sino, por el contrario, a la presencia de moduladores positivos asociados a la ASB. Por ello, probamos el efecto de una fracción de ASB libre de ácidos grasos. Esta fracción de ASB también potencia ICa-T (figura 20). Este resultado indica que la ASB no contribuye con algún lípido externo que potencie ICa-T, pero no resuelve la pregunta de que molécula está removiendo o si es la proteína misma la que ejerce su efecto como se propone en la potenciación del receptor de rianodina. Los experimentos con el 17 β -estradiol no permiten definir si la acción de potenciación de ICa-T se debe a que la ASB remueve la inhibición que el estradiol ejerce sobre este canal. Por el contrario, la potenciación de ICa-T con la ovoalbúmina (que no une colesterol y probablemente tampoco estradiol) sugiere que son eventos independientes.

Otra hipótesis propuesta es que la ASB adsorbida a la membrana aumenta su densidad de carga negativa superficial (Schmitt y Meves, 1994; Catinot et al., 1997). En consecuencia, se incrementa la concentración local de Ca^{2+} , la fuerza electromotriz y la conductancia de canales de Ca^{2+} . Un efecto similar se ha visto con polianiones como la heparina en el canal de rianodina (Bezprozvany et al., 1994). Pensamos que este mecanismo es poco probable ya que en células NG108-15 que tienen CCVDs tanto del tipo T como de alto umbral, la ASB sólo potenció las corrientes de bajo umbral (Schmitt y Meves, 1994). Además, en este trabajo usamos heparina al 0.27% (que asumiendo un peso molecular promedio de 18 kDa, corresponde a una concentración de 75 μM) y tampoco tuvo efecto sobre las ICa-T de células espermatogénicas (potenciación de $5 \pm 5\%$ por heparina vs $43 \pm 6\%$ por ASB ($n=4$), no se muestra).

Por otro lado, experimentos preliminares sugieren que la potenciación de ICa-T por ASB es dependiente de Ca^{2+} externo (pero no de Ba^{2+}) y susceptible a la tripsinización. El Ba^{2+} sustituye eficientemente al Ca^{2+} como ión acarreador de corriente a través de canales de Ca^{2+} pero no es un buen sustituto en otro tipo de procesos que dependen de este divalente. Por ejemplo, varios divalentes (excepto el Ba^{2+}) como el Mn^{2+} , el Cd^{2+} y el Co^{2+} mimetizan la hti-Ca en el espermatozoide de ratón (Espinosa y Darszon, 1995) y el Mn^{2+} y el Sr^{2+} (pero no el Mg^{2+} ni el Ba^{2+}) sustituyen al Ca^{2+} externo en la RA en el espermatozoide de carnero inducida artificialmente con el ionóforo A-23187 (Roldán y Fragió, 1993). Es posible entonces que la ASB module directamente a un "receptor" membranal durante la potenciación de ICa-T y que la interacción de ambas moléculas o la actividad de ese receptor dependan de la presencia de Ca^{2+} externo. Se sabe que la motilidad espermática, la capacitación y la RA se modulan por proteasas membranales (revisado en Lee y Wei, 1994). Se ha demostrado que diversas proteasas pueden modular canales de Na^+ (Vallet et al., 1997; Chraïbi et al., 1998), de rianodina (Rardon et al., 1990; Shoshan-Barmatz et al., 1994; Shevchenko et al., 1998), corrientes de Ca^{2+} activadas por liberación de Ca^{2+} de pozas internas (Icrac, Somasundaram et al., 1997) y CCDVs (Baron et al., 1993; De Jongh et al., 1994; Seydl et al., 1995; Hell et al., 1996), así como otras moléculas integrales de membrana (Jakobs y Grandt 1998; Okamura et al., 1990; Adeniran et al., 1995). La RA y los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos con progesterona, son abolidos en presencia de inhibidores de serin proteasas (Pillai y Meizel, 1991; Llanos y Anabalón, 1996). Se piensa que la heparina modula los niveles de Ca^{2+} durante la capacitación del espermatozoide de toro al

interactuar con una proteasa membranal (Córdoba et al., 1997). Además, se sabe que la actividad proteolítica de muchas de estas enzimas depende de Ca^{2+} . Algunas proteasas requieren de concentraciones milimolares de Ca^{2+} mientras que otras son activas a concentraciones $< 0.1 \mu\text{M}$ (Shoshan-Barmatz et al., 1994; Vachova, 1996; Michetti et al., 1997). Es interesante destacar que tanto la potenciación de canales CCDV por ASB (Chiang et al., 1993; Schmitt y Meves, 1994), como por trombina (Baron et al., 1993), son irreversibles. La ICa-T en células espermatogénicas tiene un comportamiento similar. Esto puede indicar que la potenciación de ICa-T (por ASB o algún otro "agonista") se da en situaciones específicas que no requieren de retornar a la condición inicial (v.gr., para diferenciación celular durante la espermatogénesis, durante la capacitación, o durante la RA). Otra posible explicación es que la irreversibilidad se deba a las condiciones experimentales utilizadas. En todos estos casos las corrientes de Ca^{2+} se registraron en la configuración de célula completa. En esta condición se dializan componentes solubles del citoplasma lo que puede alterar la regulación de los canales iónicos e inclusive provocar pérdida total de sus corrientes. Esto parece estar operando en las células espermatogénicas ya que si se incuban en presencia de ASB y se lavan antes de sellar a la célula para el registro, una segunda aplicación de ASB induce la potenciación esperada. Por el momento desconocemos si un mecanismo en el que participan proteasas endógenas opera durante la potenciación de ICa-T por ASB. Se diseñarán experimentos para determinar la veracidad de esta hipótesis.

FALTA PAGINA

No. 86

V. CONCLUSIONES.

- El DDF (IC50 1 μ M) y el AN (IC50 43 μ M) inhiben hti-Ca indicando la participación de canales aniónicos en este proceso.
- El AN (a concentraciones submicromolares) y el GABA potencian la hiperpolarización transitoria inducida con Ca^{2+} hasta en un 30 y un 50%, respectivamente. En experimentos donde se combinan ambos moduladores se observa que el GABA produce mayor sensibilidad de la hti-Ca a la inhibición por AN. La modulación bimodal de hti-Ca por GABA y AN documentada en este trabajo es similar a los resultados observados en estudios electrofisiológicos del R-GABA_A neuronal. Lo anterior respalda la hipótesis de que el R-GABA_A participa en la hti-Ca.
- La potencia de inhibición del AN, DDF y NPPB es mayor para la RA (y en el caso del AN, para el canal aniónico del espermatozoide) que para ICa-T de células espermatogénicas. Estos resultados sugieren que dichos compuestos inhiben la RA actuando principalmente sobre canales aniónicos (posiblemente el R-GABA_A) y resaltan la importancia de estas vías de permeabilidad iónica en la RA inducida con los diferentes agonistas utilizados (ZP, GABA y progesterona).
- La albúmina sérica potencia hasta en un 50% ICa-T en células espermatogénicas. El mecanismo de potenciación se desconoce, pero nuestros resultados indican que difiere de su efecto en la fosforilación en tirosinas durante la capacitación. Estos datos sugieren un mecanismo adicional al anteriormente propuesto por el cual la ASB podría estar modulando la capacitación del espermatozoide de ratón.

VII. PERSPECTIVAS.

- Los estudios sobre la hti-Ca demuestran la presencia de varios transportadores iónicos en la membrana plasmática y sugieren su participación en eventos relevantes para la fisiología del espermatozoide. Hasta ahora sólo se investigó el efecto de moduladores externos, queda por caracterizar que vías de transducción de señales participan en la hti-Ca.

- Los bloqueadores de canales aniónicos utilizados en este trabajo para inhibir la RA podrían servir en la contracepción humana. Su empleo práctico dependería de la distribución que muestren en fluidos uterinos y de su baja toxicidad. Los fenamatos (a los cuales pertenece el AN) se utilizan comercialmente como antiinflamatorios no esteroideos (Woodward et al., 1994) y en problemas del puerperio de la mujer. Desconocemos si el NPPB o el DDF se utilizan comercialmente, por lo que el AN es el fármaco de elección para iniciar la investigación a este nivel. En experimentos preliminares en el ratón, el AN resultó poco eficiente en la contracepción y altamente tóxico. Su baja eficiencia puede deberse a una pobre distribución en la zona de fecundación. Alternativamente estos compuestos pueden servir para el diseño de otros fármacos que alcancen concentraciones efectivas en el tejido blanco y de menor toxicidad.

- La pobre eficiencia de sellado en el espermatozoide de ratón no permitió la caracterización detallada de sus canales por la técnica de patch-clamp. Además de los problemas estéricos (célula pequeña y aplanada), la membrana del espermatozoide es relativamente rígida y contiene gran cantidad de glicocalix. Es posible que estas propiedades eviten la interacción íntima entre membrana y pipeta. Se podrían hacer tratamientos de la membrana (como el rasurado enzimático con glicosidasas) en el intento de mejorar la eficiencia del sellado.

- El efecto de la potenciación de ICa-T por albúmina podría estar participando en la fisiología de las células espermátogénicas así como del espermatozoide. Es importante determinar el mecanismo de la potenciación. Para ello se deberá ahondar en la posible intervención de proteasas membranales y de algún factor citoplásmico que se dialice durante el registro (y del que parece depender su reversibilidad).

Referencias:

- Aanesen, A., Fried, G., Andersson, E. Gottlieb, C. Progesterone Stimulates GABA uptake in human spermatozoa. *Biochim. Biophys. Res.* 226, 88-93 (1996).
- Aarons, P., Battle, T., Boettger-Tong, H. y Poirier, G. R. Role of monoclonal antibody J-23 in inducing acrosome reactions in capacitated mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 96, 49-59 (1992).
- Ademiran, A. J., Shoshani, I., Minuth, M., Awad, J.A., Elce, J. S. y Johnson, R. A. Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence of the adenylyl cyclase-activating protease from bovine sperm. *Biol. Reprod.* 52, 490-499 (1995).
- Aidley, D. J. y Stanfield, P. R. *Molecular Structures (Ch. 4). En: Ion Channels, Molecules in Action.* Cambridge University Press. Nueva York (EE. UU.), pp. 59-129 (1996).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (3rd ed.). Garland Publishing Inc., New York, NY.
- Arnoult, C., Zeng, Y., Florman, H. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* 134, 637-645 (1996a).
- Arnoult, C., Cardullo, R. A., Lemos, J. R. y Florman, H. M. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13004-13009 (1996b).
- Arnoult, C., Lemos, J. R. y Florman, H. M. Voltage-dependent modulation of T-type calcium channel by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO. J.* 16, 1593-1599 (1997).
- Arnoult, C., Villaz, M., Florman, H. Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol. Pharmacol.* 53, 1104-1111 (1998).
- Auerbach, A. y Sachs, F. Patch-clamp studies of single ionic channels. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 269-302 (1984).
- Babcock, D.F. Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore. *J. Biol. Chem.* 258, 6380-6389 (1983).
- Babcock, D.F. y Pfeiffer, D. R. Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262, 15041-15047 (1987).
- Babcock, D. F. *J. Biol. Chem.* 258, 6380-6389 (1983).
- Babcock, D.F., M.M. Bosma, D.E. Battaglia, y Darszon, A. Early persistent activation of sperm K^{+} channels by the egg peptide speract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6001-6005 (1992).
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C. y Forti, G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Front. Bios.* 1, 189-205 (1996).
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L. y Forti, G. Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications. *Front. Bios.* 3, 1051-1059 (1998).
- Baron, A., Pacaud, P., Loirand, G., Mironneau, C. y Mironneau, J. Pharmacological block of Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Eur. J. Physiol.* 419, 553-558 (1991).
- Baron, A., Loirand, G., Pacaud, P., Mironneau, C. y Mironneau, J. Dual effect of thrombin on voltage-dependent Ca^{2+} channels of portal vein smooth muscle cells. *Circ. Res.* 72, 17-25 (1993).
- Bastiaanse, E. M. L., Hold, K. M. y van der Laarse, A. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovascular Res.* 33, 272-283 (1997).
- Beebe, J.J., Leyton, L., Burks, D., Ishikawa, M., Fuerst, T., Dean, J. y Saling, P. Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 151, 48-54 (1993).
- Bellvé, A.R., Zheng, W. y Maartintova, Y. Recovery, capacitation, acrosome reaction, and fractionation of sperm. In: *Guide to techniques in mouse development.* Editores, Paul M. Wassarman y Melvin L. Depamphilis. *Methods Enzymol.* 225, 113-136.
- Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P. y Liévano, A. A high-conductance voltage-dependent multistate Ca^{2+} channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Letters.* 338, 23-26 (1994).
- Beltrán, C., O. Zapata, y. Darszon, A. Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry* 35, 7591-7598 (1996).
- Berruti, G. Biochemical characterization of the boar sperm 42 kilodalton protein tyrosine kinase: its potential for tyrosine as well as serine phosphorylation towards microtubule-associated protein 2 and histone H 2B. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 386-392 (1994).
- Bezprozvanny, I., Bexprozvannaya, S. G. y Ehrlich, B. E. Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. *Mol. Biol. Cell.* 5, 97-103 (1994).
- Blackmore P. F., Neulen, J., Lattanzio, F. y Beebe, S. J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266, 18655-18659 (1991).
- Blackmore, P. F., Neulen, J., Lattanzio, F. y Beebe, S. J. *J. Biol. Chem.* 266, 18655-18659 (1991).
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R. y Alexander, N. Progesterone an 17 α -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265, 1376-1380 (1990). Blankson, H., Holen, I. y Seglen, P.O. Disruption of the cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp. Cell Res.* 218, 522-530 (1995).
- Bleil, J. D. Sperm receptors of mammalian eggs. *En: Elements of Mammalian Fertilization.* (P. M. Wassarman, ed.), Vol. I. CRC Press, Boca Raton. pp131-151 (1991).
- Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202 (1980).
- Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317-324. (1983).
- Boatman, D. E. y Robbins, R. S. Bicarbonate carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* 44, 806-813 (1991).
- Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B., Lee, T. y Poirier, G. R. Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding. *Biol. Reprod.* 47, 716-722 (1992).
- Boettger-Tong, H., Aaron, D. J., Biegler, B. E., George, B. y Poirier, G. R. (1993). Binding of a murine proteinase inhibitor to the acrosome region of the human sperm head. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 346-353.

- Bonaccorsi, L., Luconi, M., Forti, G. y Baldi, E. Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm. *FEBS Lett.* 364, 83-86 (1995).
- Bookbinder, L. H., Cheng, A., Bleil, J. D. Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 269, 86-89 (1995).
- Borman, J., Hamill, O. P. y Sakmann, B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol.* 385, 243-286 (1987).
- Boue, F., Blais, J. y Sullivan, R. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54, 1009-1017 (1996).
- Bourinet, E., Zamponi, G. W., Stea, A., Soong, T. W., Lewis, B. A., Jones, L. P., Yue, D. y Snutch, T. P. The $\alpha 1E$ calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J. Neurosci.* 16, 4983-4993 (1996).
- Braun, R. E., Behringer, R. R., Pexchon, J. J., Brinster, R. L. y Palmiter, R. D. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337, 373-376 (1989).
- Breitbart, H. y Spungin, B. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 195-202 (1996).
- Brewis, I. A., Clayton, R., Barratt, C. L., Hornby, D. P. y Moore, H. D. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 583-589 (1996).
- Brochiero, E., Banderall, U., Lindenthal, S., Raschi, C. and Ehrenfeld, J. Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation. *Eur. J. Physiol.* 432: 32-45 (1995).
- Bukausoglu, C. y Sarlak, F. Pregnenolone sulfate increases intracellular Ca^{2+} levels in a pituitary cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 298, 79-85 (1996).
- Burks, D. J., Carballada, R., Moore, H. D. M. y Saling, P. M. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269, 83-86 (1995).
- Catnot, M. P., Bastide, B., Montel, V., Suarez-Kurtz, G. y Mounier, Y. Effect of bovine serum albumin on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 160, 199-205 (1997).
- Chan, H. C., Zhou, T. S., Fu, W. O., Wang, W. P., Shi, Y. L. and Wong, P. Y. D. Cation and anion channels in rat and human spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1323, 117-129 (1997).
- Chang, H. M., Reitstetter, R., Mason, R. P. y Gruener, R. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J. Memb. Biol.* 143, 51-63 (1995).
- Chao, L. The evolution of sex and the molecular clock in RNA viruses. *Gene* 205, 301-308 (1997).
- Chen, R. F., Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242, 173-181 (1967).
- Chiang, M., Strong, J. A. y Asem, E. K. Bovine serum albumin enhances calcium currents in chicken granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94, 27-36 (1993).
- Chraïbi, A., Vallet, V., Firsov, D., Hess, S.K. y Horisberger, J. D. Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 111, 127-38 (1998).
- Córdoba, M., Santa-Coloma, T. A., Beorlegui, N. B. y Beconi, M. T. Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41, 725-733 (1997).
- Coronel, C. E., y Lardy, H. A. Characterization of Ca^{2+} uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37, 1097-1107.
- Coronel, C. E., Winnica, D. E., Novella, M. L. y Lardy, H. A. Purification, structure and characterization of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J. Biol. Chem.* 267, 20909-20915 (1992).
- Cox, T., P. Campbell, and R.N. Peterson. Ion channels in boar sperm plasma membranes: characterization of a cation selective channel. *Mol. Reprod. Dev.* 30: 135-47, 1991.
- Cox, T., and R.N. Peterson. Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 162-168, 1989.
- Cox, T., Campbell, P. y Peterson, R. N. Ion channels in boar sperm plasma membranes: characterization of a cation selective channel. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 135-47 (1991).
- Cribbs, LL., Lrr, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Pérez-Reyes, E. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ. Res.* 83, 103-109 (1998).
- Damron, D. S., y Bond, M. Modulation of Ca^{2+} cycling in cardiac myocytes by arachidonic acid. *Circ. Res.* 72, 376-386 (1993).
- Darzon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., Espinosa, F. Ion channels in sperm physiology. *Phys. Rev.* (en prensa, 1998).
- Davis, B. K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7560-7564 (1981).
- De Jongh, K. S., Colvin, A. A., Wang, K. K. y Catterall, W. A. Differential proteolysis of the full-length form of the L-type calcium channel $\alpha 1$ subunit by calpain. *J. Neurochem.* 63, 1558-1564 (1994).
- de Visser, J. A. G. M., Hoekstra, R. F. y vandenEnde, H. Test of interaction between genetic markers that affect fitness in *Aspergillus niger*. *Evolution* 51, 1499-1505 (1997).
- de Yebra, L., Balleca, J. L., Vanrell, J. A., Bassaa, L. y Oliva, R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* 268, 10553-10557 (1993).
- de la Vega Beltrán, J. L. Tesis de Licenciatura: Efecto del ácido nítrico sobre la reacción acrosomal en el espermatozoide de ratón. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor. (1997).
- Demott, R. P. y Suárez, S. S. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* 46, 779-785 (1992).
- Djamgoz, M. Diversity of GABA receptors in the vertebrate outer retina. *Trends Neural Science* 18, 109-120 (1995).
- Doherty, C. M., Tarchala, S. M., Radwanska, E. y De Jonge, C. J. Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction. *J. Androl.* 16, 36-46 (1995).
- Doughty, J. M., Miller, A.L. y Langton, P.D. Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel. *J. Physiol. (Lond)* 507, 433-439 (1998).
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. y McKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction. *Science* 280, 69-77 (1998).
- Dunn, S. M. J. y Thynsma, R. P. Reconstitution of purified GABA_A receptors: ligand binding and chloride transporting properties. *Biochemistry* 33, 755-763 (1994).

- Eddy, A. Use of carbocyanine dyes to assay membrane potential of mouse ascites tumor cells. *In: Biomembranes Part S. Transport: Membrane Isolation and Characterization. Meth. Enzymol.* 172, 95-102 (1989).
- Egan, R.W., Humes, J.L., Juehl, Jr. F.A. (1978). Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase. *Biochemistry* 17, 2230-2234.
- Emlliozzi, C., and P. Fenichel. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod.* 56: 674-679, 1997.
- Endo, Y., S. Komatsu, M. Hirai, S. Suzuki, and N. Shimizu. Protein kinase C activity and protein phosphorylation in mouse sperm. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 43: 109-116, 1991
- Endo, Y., M.A. Lee, and G.S. Kopf. Evidence for the role of a guanine nucleotide binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 119: 210-216, 1987.
- Ertel, S.I., Ertel, E.A. (1997). Low-voltage-activated T-type Ca^{2+} channels. *Trend Pharmacol Sci* 18, 37-42.
- Espinosa, F., de la Vega, J. L., Delgado, R., Labarca, P. y Darszon, A. Mouse sperm patch-clamp recordings reveal Cl^{-} channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388, 150-154 (1998).
- Espinosa, F., López-González, I., Serrano, C. J., Gasque, G., de la Vega-Beltrán, J. L., Treviño, C. L. and Darszon, A. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca^{2+} currents of mouse spermatogenic cells, $\alpha 1E$ currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev. Genetics.* enviado (1998).
- Espinosa, F., y Darszon, A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . *FEBS Letters.* 372, 119-125 (1995).
- Evans, J. P., Kopf, G. S. y Schultz, R. M. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin β subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg $\beta 1$ integrin-mediated interaction. *Dev. Biol.* 187, 79-93 (1997).
- Evans, J. P., Schultz, R. M y Kopf, G. S. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin α subunit to mouse eggs: evidence for function as a cell adhesion molecule in sperm-egg binding. *Dev. Biol.* 187, 94-106 (1997).
- Evoniuk, G. y Skolnick, P. Picrate and niflumate block anion modulation of radioligand binding to the g-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex. *Mol. Pharmacol.* 34, 837-842 (1988).
- Falcone, L., Gianni, S., Piffaretti-Yanez, A., Marchini, M., Eppenberger, U. y Balerna, M. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity in vitro. *Fertil. Steril.* 55, 619-623 (1991).
- Fetterolf, P. M., Sutherland, C. S., Josephy, P. D., Casper, R. F. y Tyson, J. E. Preliminary characterization of a factor in human follicular fluid that stimulates human spermatozoa motion. *Hum. Reprod.* 9, 1505-1511 (1994).
- Florman, H.M., and N.L. First. The regulation of acrosomal exocytosis II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev. Biol.* 128: 464-473, 1988.
- Florman, H. M., Tombes, R.M., First, N.L. y Babcock, D.F. 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, 133-147 (1989).
- Florman, H. M. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 165, 152-164 (1994).
- Florman, H. M., Bechtol, K. B. y Wassarman, P.M. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106, 243-245 (1984).
- Florman, H., Corron, M. E., Kim, D. H. y Babcock, D. F. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 152: 304-314, 1992.
- Florman, H. y Babcock, D. F. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. *In: Elements of mammalian fertilization. I. Basic concepts*, edited by P. M. Wassarman. FL.: CRC Press, Boca Raton, 105-132 (1991).
- Florman, H. M. y First, N.L. The regulation of acrosomal exocytosis II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev. Biol.* 128, 464-473 (1988).
- Foresta, C., and M. Rossato. Calcium influx pathways in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*: 3: 1-4, 1997.
- Foresta, C., Rossato, M. y Di Virgilio, F. (1995). Differential modulation by protein kinase C of progesterone-activated responses in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 408-413 (1995).
- Foresta, C., Rossato, M., y Di Virgilio, F. Ion fluxes through progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem. J.* 294, 279-283 (1993).
- Foster, J.A., B.B. Friday, M.T. Maulit, C. Blobel, V.P. Winfrey, G.E. Olson , K.S. Kim, G.L. Gerton. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 272: 12714-12722, 1997.
- Freedman J. C. y Novak, T. S. Optical measurement of membrane potential in cells, organelles and vesicles. *In: Biomembranes Part S. Transport: Membrane Isolation and Characterization. Meth. Enzymol.* 172, 102-122 (1989).
- Froescher, P. y Smith, S.J. Actions of Cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell. Biol.* 107, 1505-1516 (1988).
- Galantino-Hommer, H. L., Visconti, P.E., y Kopf, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56, 707-719 (1997).
- Garbers, D.L. Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 719-742, 1989.
- Garner, D.L. y Hafez, E.S. E. Espermatozoides y plasma seminal. *En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* Hafez E.S.E. editor. Interamericana 5a. edición. México, D. F. (1987).
- Garty, N. B. y Salomon, Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218, 148-152 (1987).
- Gatti, J. L., C. Chevrier, M. Paquignon, and J.L. Dracheux. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 98: 439-449, 1993.
- Gether, U. y Kobilka, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273, 17979-17982 (1998).
- Gilbert, S. F. Fertilization: beginning a new organism. *En: Developmental Biology*, 4ta. ed (1994). Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts. pp 1211-158.
- Ghasner, M., Jones, J., Kligman, I., Woolkalis, M. J., Gerton, G. L. y Kopf, G. S. Immunocytochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev. Biol.*, 146: 438-450 (1991).
- Go, K. J. y Wolf, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32, 145-153 (1985).

- Gong, X., Dubois, D. H., Miller, D. J. y Shur, B. Activation of a G protein complex by aggregation of b-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269, 1718-1720 (1995).
- González-Martínez, M.T., A. Guerrero, E. Morales, L. de Delatorre, and A. Darszon. A depolarization can trigger Ca^{2+} uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in *L. pictus* sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 150: 193-202, 1992.
- González-Martínez, M., and A. Darszon. A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* 218: 247-250, 1987.
- Gore-Langton, R. E. y Armstrong, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. *En: The Physiology of Reproduction.* (Ernst Knobil y Jimmy D. Neill, ed.) Vol. I. Raven Press, Nueva York. pp 331-386 (1988).
- Guerrero, A., Sánchez, J. A. y Darszon, A. Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique. *FEBS Lett.* 220, 295-298 (1987).
- Guerrero, A., and A. Darszon. 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, 1989.
- Guy, H. R. y Seetharamulu, P. Molecular Model of the action potential sodium channel. *Proced. Nat. Acad. Sci. USA* 83, 508-12 (1986).
- Gyenes, M., Wang, Q., Gibbs, T. T. y Farb, D. H. Phosphorylation factor control neurotransmitter and neuromodulation action at the -aminobutyric acid type A receptor. *Mol. Pharmacol.* 46, 542-549 (1994).
- Hagiwara, S. y Kawa, K. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J. Physiol. (Lond.)* 356, 135-149 (1984).
- Hall, J.A., Kirk, J., Potts, J.R., Rae, C. and Kirk, K. Anion channel blockers inhibit swelling-activated anion, cation and nonelectrolyte transpor in HeLA cells. *Am. J. Physiol.*, 40: C579-C588 (1996).
- Harrison, N. L., Majewska, M. D., Harrington, J. W. y Baker, J. L. 1987. Structure -activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid A receptor complex. *J. Pharmacol. , Exp. Therap.* 241, 346-253 (1987).
- He, X. M. y Carter, D. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209-215 (1992).
- Heldin, C. H. Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv.* 27, 7-24 (1996).
- Hell, J.W., Westernbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C. y Catterall, W. A. N-methyl-D-Aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 16, 3362-3367 (1996).
- Hess, H., Held, H., Zimbelmann, R. y Franke, W.W. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp. Cell. Res.* 218, 174-182 (1995).
- Hecht, N.B. Regulation of haploid expressed genes in male germ cells. *J. Reprod. Fer.* 88, 679-693 (1990).
- Hildebrand, J. D., Codina, J., Tash, J. S. Kirchick, H. J., Lipschultz, L., Sekura, R. D. y Brinbaumer, L. The membrane-bound spermatozoal adenylyl cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylyl cyclases. *Endocrinology* 116, 1357-1366 (1985).
- Hille, B. "Ionic channels of excitable membranes". (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. (1992).
- Höpp, H. P., Wu, J.Y., Falk, C. W., Rioult, M. G., London, J. A., Zecevic, D. y Cohen, L. B. Multisite optical measurement of membrane potential. In: *Neurophysiological Methods Techniques. Basic Methods and Concepts.* Editores Boulton A. A. y Baker G. B. Humana. pp 193-223, (1990).
- Huguenard, J. R. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 329-348 (1996).
- Jakobs, K. H. y Grand, R. Thrombin-like inhibitory action of trypsin and trypsin-like proteases on human platelet adenylyl cyclase. *Eur. J. Biochem.* 172, 255-260 (1988).
- Hurst, L. D. y Peck, J. R. Recent advances in understanding of the evolution and maintainance of sex. *TREE* 11,46-52 (1996).
- Jansen, R. P., y Bajpai, V. K. Periovalvatory glycoprotein secretion in the macaque fallopian tube. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147, 598-608 (1983).
- Jones, R., Shalgi, R., Hoyland, J. y Phillips, D. M. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. *Dev. Biol.* 139, 349-362 (1990).
- Kalab, P., P. Visconti, P. Leclerc, and G. S. Kopf. p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J. Biol. Chem.* 269: 3810-3817, 1994.
- Kanli, H. y Norderhus, E. Cell volume regulation in proximal renal tubules from trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.* 201, 1405-1419 (1998).
- Kim, D. A mechanosensitive K^{+} channel in heart cells. Activation by arachidonic acid. *J. Gen. Physiol.* 100, 1021-1040 (1992).
- Kleinhans, F., Travis, V. S., Du, J. Y., Villines, P. M., Colvin, K. E. y Crister, J. K. Measurement of human sperm intracellular water volume by electron spin resonance. *J. Androl.* 13, 4498-506 (1992).
- Klöckner, U., Mikala, G., Varadi, M., Varadi, G. y Schwartz, A. Involvement of the carboxyl-terminal region of the $\alpha 1$ subunit in voltage-dependent inactivation of cardiac calcium channels. *J. Biol. Chem.* 270, 17306-17310, 1005.
- Kopf, G.S. and G.L. Gerton. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. *En: Elements of Mammalian Fertilization. I. Basic Concepts,* edited by P. M. Wassarman. FL: CRC Press, Boca Raton CRC Uniscience Series, 1990, p. 153-203.
- Kopf, G.S., M.J. Woolkalis, and G.L.Gerton. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J. Biol. Chem.* 261: 7327-7331, 1986.
- Krester, D.M. y Kerr, J. B. The cytology of the testis. *En: The Physiology of Reproduction.* (Ernst Knobil y Jimmy D. Neill, ed.) Vol. I. Raven Press, Nueva York. pp 837-932 (1988).
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R. y Gullman, A.G. Adenylyl cyclase aminoacid sequence: possible channel or transporter like structure. *Science.* 244, 1558-1564, (1989).
- Kvist, U. Spermatozoal thiol-disulphide interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. *Acta Physiol. Scand.* 114, 503-505 (1982).
- Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrn, C., Liévano, A. y Darszon A. A cAMP K^{+} -selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev. Biol.* 174, 271-280 (1996).
- Labarca, P., Zapata, O., Beltrn, C. y Darszon, A. Ion channels from the mouse sperm plasma membrane in planar lipid bilayers. *Zygote* 3, 199-206 (1995).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.

- Lakoski, K. A., Carron, P. C., Cabot, C. L. y Saing, P. M. Epididymal maturation and the acrosome reaction ;in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 38, 221-233 (1988).
- Langlais, J., Kan, F. W., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G. y Roberts, K. D. Identification of sterol acceptors stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20, 185-201 (1988).
- Larson, J. L. and Miller, D. J. Sperm from a variety of mammalian species express b1,4-galactosyltransferase on their surface. *Biol. Reprod.* 57, 442-453 (1997).
- Latorre, R. y Álvarez, O. Vías y Modelos de Transporte a través de Membranas. En: *Biofísica y Fisiología Celular*. Editores, Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., y Llinás, R. Universidad de Sevilla, Sevilla, España. pp. 71-118 (1996).
- Lax, Y., S. Rubinstein, and H. Breitbart. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett.* 339: 234-238, 1994.
- Lax, Y., Rubinstein, S. y Breitbart, H. Subcellular distribution of PKCa and b1 in bovine spermatozoa and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol. Reprod.* 56, 454-459 (1997).
- Lee, S-L. y Wie, Y-H. The involvement of extracellular proteinases and proteinase inhibitors in mammalian fertilization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19, 31-40 (1994).
- Lee, M.A., J.H. Check, and G.S. Kopf. A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 78-86, 1992.
- Lee, M. A. y Storey, B. T. *Biol. Reprod.* 33, 235-246 (1985).
- Leyton, L., Tomes, C. y Saling, P. LL95 monoclonal antibody mimics functional effects of ZP3 on mouse sperm: evidence that the antigen recognized is not hexokinase. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 347-358 (1995).
- Leyton, L., P. LeGuen, D. Bunch, and P. M.Saling. Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11692-11695, 1992.
- Leyton, L. y Saling, P. 95 kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosin kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57, 1123-1130 (1989).
- Liévano, A., J. Sánchez, and A. Darszon. Single channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Dev. Biol.* 112: 235-257, 1985.
- Liévano, A., Santi, C.M., Serrano, C.J., Treviño, C.L., Bellvé, A.R., Hernández-Cruz, A. y Darszon, A. 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).
- Liévano, A., Bolden, A. y Horn, R. Calcium channels in excitable cells: divergent genotypic an phenotypic expression of α_1 -subunits. *Am. J. Physiol.* 36, C411-C424 (1994).
- Liévano, A., Vega Saenz de Miera, E. C. y Darszon, A. Ca²⁺ channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296 (1990).
- Lindemann, C. B. y Kanous, K. S. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch. Androl.* 23, 1-22 (1989).
- Litscher, E. S. y Wassarmann, P. M. Characterization of mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity in vitro. *Biochemistry* 35, 3980-3985 (1996).
- Llanos, M. M. y Anabalon, M. Studies related to the progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 313-319 (1996).
- Longo, F.J., Krohne, G. y Franke W.W. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell Biol.* 105, 1105-1120 (1987).
- López González, I. Tesis de Licenciatura: Caracterización de canales iónicos en células espermatogénicas de ratón. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Edo. Mex. (1996).
- Lu, X., Xu, L. y Meissner, G. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 6511-6516 (1994).
- Luconi, M., Krausz, C., Forti, G. y Baldi, E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 55, 207-216 (1996).
- Lundbaek, J. A., Birn, P., Girshuman, J., Hanen, A. J. y Andersen, O. S. Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry* 35, 3825-3830 (1996).
- Majewska, M. D. En: *Steroid regulation of the GABAA receptor : ligand binding chloride transport and behavior* (Wiley, J E., Ed.). Steroid and neuronal activity pp 83-91. Wiley Interscience Publication. New York. USA (1990).
- Matteson, D. R. y Armstrong, C. M. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87,161-182 (1986).
- McDonald, R.L. y Olsen, R. W. GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 596-602 (1994).
- McLeakey, S. B., Dowds, C., Carballada, R., White, R. R. y Saling P. M. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int. Rev. Cytol.* 177, 57-113 (1998).
- Meil, X. H., Singh, I. S., Ehrlichman, J. y Orr, G. A. Cloning and characterization of a testis -specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm. *Eur. J. Biochem.* 246, 425-432 (1997).
- Meir, A. y Dolphin, A. Known calcium channel α_1 subunits can form low threshold small conductance channels with similarities to native T-type channels. *Neuron* 20, 341-351 (1998).
- Meix, X. H., Singh, I. S., Ehrlichman, J. y Orr, G. A. Cloning and characterization of a testis-specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm. *Eur. J. Biochem.* 246, 425-432 (1997).
- Meizel, S., Turner, K. O. y Nuccitelli, R. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 182, 67-75 (1997).
- Meizel, S. Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 56: 569-574, 1997.
- Meizel, S. y Turner, K. O. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavenductin A, a tyrosine kinase inhibitor. *J. Androl.* 17, 327-330 (1996).
- Meléndez, C. and Meizel, S. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 53, 676-683 (1995).
- Mendoza, C., Soler, A. y Tesarik, J. Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 518-523 (1995).

- Mendoza, C. y Tesarik, J. A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett.* 330, 57-60 (1993).
- Menezes, Y. y Guerin, P. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 73, 99-104 (1997).
- Mermelstein, P. G., Becker, J. B. y Surmeier, D. J. Estradiol reduces calcium currents in rat neonatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.* 16, 595-604 (1996).
- Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R., Melloni, E. Pontremoli, S. Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem. J.* 325 (pt 3), 721-726 (1997).
- Müller, C. How ion channel proteins work. *En: Neuromodulation.* pp. 39-63 (1986).
- Miller, D. J., Macek, M. B. y Shur, B. D. Complementarity between
- Moller, C. C., Bleil, J. D., Kinlock, R. A., y Wassarman, P. M. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev. Biol.* 132, 276-8 (1989).
- Montal, M., Montal, M. S. y Tomich, J. M. Synporins-synthetic proteins that emulate the pore structure of biological ionic channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6929-6933 (1990).
- Morales, E., L. de De la Torre, G. Moy, V.D. Vacquier, and A. Darszon. Anion channels in the sea urchin sperm plasma membrane. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 174-182, 1993.
- Mortimer, F. y Carmenzind, A. R. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum. Reprod.* 4, 169-174 (1989).
- Murase, T. y Roldán E. R. S. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosome reaction. *Biochem. J.* 320 (Pt. 3), 1017-1023 (1996).
- Mykles, D.L. y Skinner, D.M. Four Ca²⁺-dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge and sensitivity to Ca²⁺ and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261, 9865- 9871 (1986).
- Myles, D. G., Koppel, D. E., Cowan, A. E., Phelps, B. M. y Primakoff, P. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 513, 262-273 (1987).
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y.. 17beta-estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 625-635 (1995).
- Nakamura, M., M. Moriya, T. Baba, Y. Michikawa, T. Yamanobe, K. Arai, S. Okinaga, and T. Kobayashi. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp. Cell Res.* 205: 101-110, 1993.
- Narahashi, T., Tsunoo, A. y Yoshi, M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* 383, 231-239 (1987).
- Naz, R. K., Morte, C., Ahmad, K., Martinez, P. Hexokinase present in human sperm is not tyrosien phosphorylated but its antibodies affect fertilizing capacity. *J. Androl.* 17, 143-150 (1996).
- O'toole, C. M. R., Roldán, E. R. S. y Fraser, L. R. Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 204-211 (1996).
- O'toole, C.M.B., E.R.S. Roldán, and L.R. Fraser. Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 204-211, 1996.
- O'toole, C.M.B., E.R.S. Roldán, P. Hampton, and L.R. Fraser. A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 317-326, 1996.
- Oba, T. Niflumic acid differentially modulates two types of skeletal ryanodine-sensitive Ca²⁺-release channels. *Am J Physiol* 42:C1588-C1595 (1997).
- Oblatt-Montal, M., Bühler, L. K., Iwamoto, T., Tomich, J. M. y Montal, M. Synthetic peptides and four-helix bundle proteins as model systems for the pore-forming structure of channel proteins. 1. Transmembrane segment M2 of the nicotinic cholinergic receptor channel is a key pore-lining structure. *J. Biol. Chem.* 268,14601-14607 (1993).
- Obrietan, K. y van den Pol, A. N. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺. *J. Neurosci.* 15, 5065-5077 (1995).
- Obrietan, K. y van den Pol, A. N. Neuropeptide Y depresses GABA-mediated calcium transients in developing suprachiasmatic nucleus neurons: a novel form of calcium long-term depression. *J. Neurosci.* 16, 3521-3533 (1996).
- Ochs, D., Wolf, D. P. Ochs, R. Intermediate filament proteins in human sperm heads. *Exp. Cell Res.* 167, 495-504 (1986).
- Okamura, N., S. Onoe, K. Kawakura, Y. Tajima, and Y. Sugita. Effects of a membrane-bound trypsin-like proteinase and seminal proteinase inhibitors on the bicarbonate-sensitive adenylate cyclase in porcine sperm plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1035: 83-89, 1990.
- Okamura, N., Onoe, S., Kawakura, K., Tajima, Y. y Sugita, Y. Effects of a membrane-bound trypsin-like proteinase and seminal cyclase in porcine sperm plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 83-89 (1990).
- Okamura, N., Onoe, S., Kawakura, K., Tajima, Y. y Sugita, Y. Effects of a membrane-bound trypsin-like proteinase and seminal proteinase inhibitors on the bicarbonate-sensitive adenylate cyclase in porcine sperm plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 83-89 (1990).
- Ortiz, M. E., Gajardo, G., Leon, C. G., Herrera, E., Valdez, E. Crozatto, H. B. Sperm migration through the female genital tract of the new world monkey *Cebus apella*. *Biol. Reprod.* 52, 1121-1128 (1995).
- Parent L, Schneider T, Moore CP, Tawlar D. Subunit regulation of human brain α1E calcium channel. *J Membrane Biol* 160:67-70.(1997).
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, and N.L. First. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41, 683-699 (1989).
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, and N.L. First. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 51, 1099-1108 (1994).
- Penning TM, Sharp RB, Krieger NR (1985): Purification and properties of 3α-hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem* 260: 15266-15272.
- Pérez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barcaly, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M. and Lee, J. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391, 896-900 (1998a).

- Pérez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Yang, J., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. y Lee, J.H. Molecular characterization of T-type calcium channels. In: Nargeot, J., Clozel, J-P. y Tsien, R.W. (eds): "T-type calcium channels." Chester, UK: Adis Press, pp 290-305 (1998b).
- Persson, H., Pelto-Hulkko, M., Metsis, M., Soder, O., Brené, S., Skog, S., Hokflet, T. y Ritzén, E.M. Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol. Cell Biol.* 10, 4701-4711 (1990).
- Piedras-Rentería, E.S., Tsien, R.W. Antisense oligonucleotides against $\alpha 1E$ reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7760-7765 (1998).
- Piedras-Rentería, E. S., Chen, C. y Best, P. Antisense oligonucleotides against rat brain $\alpha 1E$ DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14936-14941 (1997).
- Pillal, M.C. y Meizel, S. Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zoology*. 258, 384-393 (1991).
- Purdy, B. G. y Bayer, R. J. Genetic variation in populations of the endemic *Achillea millefolium* ssp *megacephala* from the Athabasca sand dunes and the widespread ssp *lanulosa* in western North America. *Can. J. Bot.* 74, 1138-1146 (1996).
- Rabow, L.E., S.J. Russek, and D.H. Farb. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* 21: 189-274, 1995.
- Rardon, D. P., Cefali, D. C., Mitchell, R. D., Seiler, S. M., Hathaway, D. R. y Jones, L. R. Digestion of cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles with calpain II. Effects on the Ca^{2+} release channel. *Circ. Res.* 67, 84-96 (1990).
- Raymond C. S., Shamur, C. E., Shen, M. M., Seifert, K. L., Hirsch, B., Hodgkin, J. y Zarkower, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391, 691-695 (1998).
- Reynaud, E., De de la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. y Darszon, A. Ionic basis of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Letters* 329, 210-214 (1993).
- Revelli, A., Massobrio, M. y Tesarik, J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Rev.* 19, 3-17 (1998).
- Roldán, E.R. y Fragió, C. Phospholipase A2 activity and exocytosis of the ram sperm acrosome: regulation by bivalent cations. *Biochim. Biophys Acta* (1993).
- Roldán, E. R. S., Murase, T. y Shi Q. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266, 1578-1581 (1994).
- Rossiere, T. K. y Wassarman, P.M. Identification of a region of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. *Dev. Biol.* 154, 309-317 (1992).
- Rotem, R., G.F. Paz, Z.T. Homonnai, M. Kalina, J. Lax, H. Breitbart, and Z. Naor. Ca^{2+} -independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. *Endocrinology* 131, 2235-2243 (1992).
- Russell, L. d., Vogl, A. W., y Weber, J. E. Actin localization in male germ cell intercellular bridges in the rat and ground squirrel and disruption of bridges by cythocalasin D. *Am. J. Anat.*, 180: 25-40 (1987).
- Ryan, S. E., Demers, C. N., Chew, J. P. y Baenziger, J. E. Structural effects of neutral and anionic lipids on the nicotinic acetylcholine receptor. An infrared difference spectroscopy study. *J. Biol. Chem.* 271, 24590-24597 (1996).
- Sabeur, K., Edwards, D. P. y Meizel, S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 54, 993-1001 (1996).
- Sagan, D y Margulis, L. The riddle of sex. *Science Teacher* 52, (1985).
- Santi, S. Rubbini, S., Cinti, C., Squarzone, S., Matteucci, A., Caramelli, E., Guidotti, L. y Maraldi, N. M. Nuclear matrix involvement in sperm head structural organization. *Biol. Cell* 81, 47-57 (1994).
- Santi, C.M., Darszon, A., Hernández-Cruz, A. 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), C 1583-1593 (1996).
- Santi, C.M., Santos, T., Hernández-Cruz, A. y Darszon, A. Properties of a novel pH-dependent Ca^{2+} permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mouse sperm function. *J. Gen. Physiol.* 112, 33-53 (1998).
- Schmitt, H. Meves, H. Bovine serum albumin selectively increases the low-voltage-activated calcium current of NG108-15 neuroblastoma x glioma cells. *Brain Res.* 656, 375-380 (1994).
- Schrelber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M. y Salkoff, L. Slo3, a novel pH-sensitive K^{+} channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 3509-3516 (1998).
- Schultz, J.E., Klumpp, S., Benz, R., Schurhoff-Goeters, W.J.Ch. y Schmid, A. Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science*. 255: 322-326 (1992).
- Sengoku, K., Tamate, K., Takuma, N., Takaoka, Y., Yoshida, T., Nishiwaki, K. y Ishikawa, M. Involvement of protein kinases in platelet activating factor-induced acrosome reaction of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 401-404 (1996).
- Seydl, K., Karhson, J. O., Dominik, A., Gruber, H. y Romanin, C. Action of calpastatin in prevention of cardiac L-type Ca^{2+} channel run-down cannot be mimicked by synthetic calpain inhibitors. *Eur. J. Physiol.* 429, 503-510 (1995).
- Shalgi, R. y Phillips, D. M. Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol. Reprod.* 39, 1207-1213 (1988).
- Shalgi, R. y Phillips, D. M. Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol. Reprod.* 39, 1207-1213 (1988).
- Shevchenko, S., Feng, W., Varsanyi, M. Shoshan-Barmatz, V. Identification, characterization and partial purification of a thiol-protease which cleaves specifically the skeletal muscle ryanodin receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Membr. Biol.* 161, 33-43.
- Shi, Q., Yuan, Y.Y., y Roldán, E. R. S. γ -aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 677-683 (1997).
- Shi, Q. y Roldán, E. R. S. Evidence that a GABA_A-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 52, 373-381 (1995).
- Shi, Q. X. y Roldán, E. R. Bicarbonate/ CO_2 is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol. Reprod.* 52, 540-546 (1995).
- Shlomi, H., Yamano, S., Shono, M. y Anono, T. Characteristics of calcium ion influx induced by human follicular fluid in individual human sperm. *Arch. Androl.* 37, 79-86 (1996).
- Shoshan-Barmatz, V. Wil, S., Meyer, H., Varsanyi, M. Heilmeyer, L. M. Endogenous, Ca^{2+} -dependent cysteine-protease cleaves specifically the ryanodin receptor/ Ca^{2+} release channel in skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 142, 281-288 (1994).
- Sigel, E., Baur, R., Malherbe, P. y Möhler, H. The rat β_1 -subunit of the GABA_A receptor forms a picrotoxin-sensitive anion channel open in the absence of GABA. *FEBS Lett.* 257, 377-379 (1989).

- Sitzler, G. Lenz, O., Kilter, H., La Rosee, K. y Bohm, M. Investigation of the negative ionotropic effects of 17-beta-oestradiol in human isolated myocardial tissues. *Br. J. Pharmacol.* 119, 43-48 (1996).
- Soldatov, N., Murat, O. K. A., O'Brien, Abernety, D. R. y Morad, M. Molecular determinants of L-type Ca^{2+} channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 273, 957-963 (1998).
- Somasundaram, B., Mason, M.J., Mahaut-Smith, M. P. Thrombin-dependent calcium signalling in single human erythroleukaemia cells. *J. Physiol.* 501, 485-495 (1997).
- Sonders, M.S. y Amara, S.G. Channels in transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 294-302 (1995).
- Soong, T. W., Stea, A., Hodson, A., Dubel, S. J., Vincent, S. R., y Snutch, T. P. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136 (1993).
- Spungin, B. y Breitbart, H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J. Cell. Sci.* 109, 1947-1955 (1995).
- Spungin, B., Margalit, I. y Breitbart, H. A 70 kDa is transferred from the acrosomal to the plasma membrane during capacitation. *FEBS Letters* 357, 98-102 (1995).
- Stephens, G.J., Page, K.M., Burley, J. R., Berrow, N.S. y Dolphin, A.C. Functional expression of rat brain cloned $\alpha 1E$ calcium channels in COS-7 cells. *Eur. J. Physiol.* 433, 523-532 (1997).
- Storey, B. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 927-942 (1995).
- Stühmer, W. y Latorre, R. Biología Molecular de los Canales Iónicos. En: *Biología y Fisiología Celular*. Editores, Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., and Llinás, R. Universidad de Sevilla, Sevilla, España. pp. 285-309 (1996).
- Sunshine, C. y McNamee, M. G. Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function; the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 59-64 (1994).
- Tahares, L. López-Barneo, J. Canales de Calcio En: *Biología y Fisiología Celular*. Editores, Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., and Llinás, R. Universidad de Sevilla, Sevilla, España. pp. 313-330 (1996).
- Takeuchi, K., Guggino, S.E. 24R,25-(OH)₂ vitamin D3 inhibits 1 α ,25(OH)₂ vitamin D3 and testosterone potentiation of calcium channels in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 271:33335-33343 (1996).
- Terada, H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 225-42 (1981).
- Tesarik, J., Mendoza, C., Moos, J., Fénichel, P. y Fehlmann, M. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 308, 116-120 (1992).
- Tesarik, J. and Mendoza, C. Insights into the function of a sperm-surface progesterone receptor: evidence of ligand-induced receptor aggregation and the implication of proteolysis. *Exp. Cell Res.* 205, 111-117 (1993a).
- Tesarik, J., Carreras, A., and Mendoza, C. Differential sensitivity of progesterone- and Zona pellucida-induced acrosome reactions to Pertussis toxin. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 183-189 (1993b).
- Tesarik, J., Moos, J. y Mendoza, C. Stimulation of a protein tyrosine phosphorylation by progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133, 328-333 (1993c).
- Thomas, R. C. Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. *J. Physiol.* 201, 495-514 (1969).
- Thomas, P., and S. Meizel. Phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 264: 539-546, 1989.
- Tigyí, G. y Miledí, R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 phechromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 267, 21360-21367 (1992).
- Tilmán, M., Kunzelmann, K., Fröbe, U., Cabantchik, I., Lang, H.J., Englert, H.C. y Greger. Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Eur. J. Physiol.* 418, 556-563 (1991).
- Tiwari-Woodruff, S.T. y Cox, T.C. Boar sperm plasma membrane Ca^{2+} -selective channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 268: C1284-C1294, 1995.
- Tiwari-Woodruff, S.K. y Cox, T.C. Boar sperm plasma membrane Ca^{2+} -selective channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 268, 1284-1294 (1995).
- Topfer-Petersen, E., Fiess, A. E., Stoffel, M. y Schill, W. B. Boar sperm membranes antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* 93, 491-495 (1990).
- Töpfer-Petersen, E., Fiess, A. E., Stöffel, M. y Schill, W. B. Boar sperm membranes antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and the acrosome reaction. *Histochemistry* 93, 491-495, (1990).
- Toro, L. y Stefani, E. Calcium-activated K^{+} channels: metabolic regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 561-576, (1991).
- Travis, A. J., Foster, J. A., Rosenbaum, N. A., Visconti, P. E., Gerton, G. L., Kopf, G. S. y Moss, S. B. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol. Biol. Cell* 9, 263-76.
- Treviño, C. L., Santi, C. M., Beltrán, C., Hernández-Cruz, A., Darzon, A. and Lomeli, H. Localization of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote* 6, 159-172 (1998).
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D., Bely, K. y Fox, A. Reflections on Ca^{2+} -channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.* 18, 32-54 (1995).
- Turner, K. O., and S. Meizel. Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 774-780, 1995.
- Uguz, C., Vredenburg, W. L. y Parrish, J. J. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by RP-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol. Reprod.* 51, 1031-1039, (1994).
- Unwin, N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2229, 1101-1124 (1993).
- Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373, 37-43 (1995).
- Vachova, L. Activation of the intracellular Ca^{2+} -dependent serine protease ISP1 of *vacillum megaterium* by purification or by high Ca^{2+} concentrations. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 947-954 (1996).
- Valencia, A., Wens, M. A., Merchant, H., Reyes, R. y Delgado, N. M. Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch. Androl.* 12 Suppl., 109-113 (1984).
- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaegele, H. P., Horisberger, J. D. y Rossier, B. C. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive. *Nature*, 389, 607-610 (1997).
- Varadi, G., Mori, Y., Milkala, G., Schwartz, A. Molecular determinants of Ca^{2+} channel function and drug action. *Trend. Pharmacol. Sci.* 18, 37-42 (1995).

- Villarroya, S. y Scholler, R. Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and induction of the acrosome reaction in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 80, 545-562 (1987).
- Visconti P. E. y Kopf, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 1-6 (1998).
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137 (1995a)
- Visconti, P. E., Muschetti, J. P., Flawia, M. M y Tezon, J. G. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 89, 135-48 (1990).
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Lecler, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-1150 (1995b).
- von Bulow, M., Heid, H., Hess, H. y Franke, W.W. Molecular nature of caliclin, a major basic Protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 219, 407-413 (1995).
- Vredenburg-Wilberg, W. L. y Parrish, J. J. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 490-502 (1995).
- Walensky, L. D. y Snyder, S. H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 130, 857-859 (1995).
- Walsh, K.B. y Wang, C. Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L-type calcium currents. *Cardiovas. Res.* 32, 391-399 (1993).
- Ward, C. R. y Storey, B. T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 104, 287-296 (1984).
- Ward, C.R., Storey, B.T. y Kopf, G.S. Activation a G1 protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 267:14061-14067 (1992).
- Ward, C.R., B.T. Storey, and G.S. Kopf. Selective activation of G11 and G12 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 269: 13254-13258, 1994.
- Weber, J. E. y Russell, L. D. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am. J. Anat.* 180, 1-24 (1987).
- Wehling, M. Specific, non genomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 365-393 (1997).
- Weyand, I., M. Godde, S. Frings, J. Welner, F. Muller, W. Altenhofen, H. Hatt, and B. Kaupp. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature (Lond.)* 368, 859-863, (1994).
- White, M. y Aylwin, M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 37, 720-724 (1990).
- White, D. R. y Altken, R. J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22, 163-177 (1989).
- Wickman, K. y Clapham, D. E. G-protein regulation of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 278-285 (1995).
- Williams, M. E., Marubio, L. M., Deal, C. R., Hans, M., Brust, P. F., Phillipson, L. H., Miller, R. J., Johnson, E. C., Jarpold, M. M. y Ellis, S. B. Structure and functional characterization of neuronal $\alpha 1E$ Calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* 269, 22347-22357 (1994).
- Wistrom, C.A. y Meizel, S. Evidence supporting involvement of a unique human steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev. Biol.* 159, 679-690 (1993).
- Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. Effects of fenamates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat brain GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 268, 806-817 (1994).
- Yagi, A. y Paranko, J. Actin, α -actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat. Rec.* 241, 77-87 (1995).
- Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. *En: The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. (Ernst Knobil y Jimmy D. Neil, ed.) Vol. 1. Raven Press, Nueva York. pp 189-318 (1994).
- Yassin, M., Zong, S. y Tanabe T. G-protein modulation of neuronal class E ($\alpha 1E$) calcium channel expressed in GH3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 453-58 (1996).
- Youakim, A., Hathaway, H. J., Miller, D. J., Gong, X. y Shur, B. D. Overexpressing sperm surface β 1,4-galactosyltransferase in transgenic mice affects multiple aspects of sperm-egg interactions. *J. Cell. Biol.* 126, 1573-1583 (1994).
- Young, G. P., Koide, S. S., Goldsterin, M. y Young, J. D. E. Isolation and partial purification of an anion channel protein from human sperm membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 262 : 193-225, 1988.
- Zamponi, G. W., Soong, T. W., Bourinet, E. y Snutch, T. P. $\alpha 1$ subunit coexpression and the $\alpha 1$ subunit domain I-II linker affect piperidin block of neuronal calcium channels. *J. Neurosci.* 16, 2430-2433 (1996).
- Zeng, Y., Clark, E. N. y Florman, H. M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171, 554-563 (1995).
- Zeng, Y., Oberdorf, J. A. y Florman H. M. 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 (1996).
- Zhang, J., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W. y Tsien, R. W. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372, 97-100 (1994).
- Zheng, X., Zechmeister-Machhart, M., Uhrin, P., Hufnagl, P., Geiger, M. y Binder, B. R. Effect of protein C inhibitor (PCI) on in vitro fertilization. (1996).
- Zühlke, R. D. y Reuter, H. Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the $\alpha 1C$ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3287-3294 (1998).

Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl^- channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction

F. Espinosa^a, J.L. de la Vega-Beltrán^a, I. López-González^a, R. Delgado^b, P. Labarca^b,
A. Darszon^{a,*}

^aDepto. Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. 510-3, Cuernavaca Morelos 62271, Mexico

^bCentro de Estudios Científicos de Santiago and Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Received 11 February 1998

Abstract Ion channels lie at the heart of gamete signaling. Understanding their regulation will improve our knowledge of sperm physiology, and may lead to novel contraceptive strategies. Sperm are tiny ($\sim 3 \mu\text{m}$ diameter) and, until now, direct evidence of ion channel activity in these cells was lacking. Using patch-clamp recording we document here, for the first time, the presence of cationic and anionic channels in mouse sperm. Anion selective channels were blocked by niflumic acid (NA) ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$). The blocker was effective also in inhibiting the acrosome reaction induced by the zona pellucida, GABA or progesterone. These observations suggest that Cl^- channels participate in the sperm acrosome reaction in mammals.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Acrosome reaction; Ion channel; Niflumic acid; Sperm patch-clamp recording

1. Introduction

Ion channels are deeply involved in the egg-sperm dialogue. Components from the outer layer of the egg induce changes in sperm permeability to ions which, depending on the species, regulate sperm motility, chemotaxis and the acrosome reaction (AR). This reaction is required for sperm to fertilize the egg in many species, including man. The egg's extracellular matrix, the zona pellucida (ZP), induces the AR in mammals [1]. Nonetheless, other agents like γ -aminobutyric acid (GABA) and progesterone can induce this reaction [2–6]. The sperm AR is inhibited by ion channel blockers, evidencing their predominant role in this process, and their suitability as targets for contraception [7].

Due to the small size of sperm thus far only planar bilayer techniques have yielded direct information about their ion channels [8–12]. To explore how ion channels participate in the AR we have recorded single channel currents directly from mouse sperm. Here, using patch-clamp recording we document, for the first time, the presence of cation and anion channels in mammalian sperm head plasma membrane. Anion selective channels were blocked by niflumic acid (NA) ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$). The blocker inhibits also the acrosome reaction induced by the zona pellucida, GABA or progesterone, suggesting that Cl^- channels participate in the sperm AR in

mammals. Voltage-gated Cl^- currents, blocked by μM NA ($\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$), were monitored also in pachytene spermatocytes [13–15], indicating that NA sensitive Cl^- channels are expressed early in spermatocyte differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Sperm collection and AR induction

Sperm were obtained from CD-1 mice $>3\frac{1}{2}$ months killed by cervical dislocation. The cells were collected from excised epididymides as described [16]. Cells ($3.6 \times 10^6/\text{ml}$) were suspended in M-199 media (from Sigma) supplemented with 25 mM NaHCO_3 , 1 mM sodium pyruvate and 0.4% glucose, and were capacitated at 37°C for 30 min in 5% CO_2 atmosphere. Thereafter the agents (heat-solubilized ZP, progesterone or GABA) were added and cells were left to acrosome react for 30 min. Inhibition was studied with the same procedure except that the blocker was added 5 min prior to the agonist. At the end of the experiment AR was determined by established procedures [17,18]. A minimum of 100 sperm were counted under light field microscopy and expressed as the fraction of reacted sperm induced by the agonist vs. a maximum of reacted sperm obtained with the Ca^{2+} ionophore A-23187 (AR/ARA-23) at $15 \mu\text{M}$.

2.2. Electrophysiology

2.2.1. Sperm. Seals were obtained using Kimax or 7052 glass pipettes having >5 megaohms resistance and $<1 \mu\text{m}$ of tip diameter. Sperm were rinsed for 10 min in (mM): 60 NaCl, 150 sucrose, 20 sodium lactate, 1 sodium pyruvate, 5.6 glucose, 1 EDTA, 10 benzamide and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin; pH 8.4, pelleted at $325 \times g$ for 10 min at room temperature in cylindrical 2 ml Eppendorf tubes before patch-clamping them. The pelleted cells were resuspended, left for 10 min at $20\text{--}23^\circ\text{C}$ and then placed on ice. An aliquot was allowed to settle for 5–10 min on a coverslip and placed in a recording chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp.) endowed with Hoffman Optics. Experiments were done at $20\text{--}23^\circ\text{C}$ and currents monitored with and Axoclamp 1-B amplifier (Axon instruments, Foster City, CA), sampling at 10–25 kHz, and filtering at 2–5 kHz. Data analysis was performed with Pclamp6 routines. Patch-clamping the sperm head is laborious due to its small size and flatness. A perpendicular approach between pipette and cell surface is necessary to achieve high resistance seals (>1 gigaohms, Fig. 1A). This occurred only in $\sim 7\%$ of trials, out of which $\sim 80\%$ displayed single channel activity. In 25% of the high resistance seals spontaneous excised patches were obtained. In this cases the polarity of the membrane patch was not known. Excised patches were lost very rapidly, therefore, ion substitution experiments were not possible and data were acquired only with the solution used during sealing. Analysis was done only on records with >5 megaohms of seal resistance. Apparent permeability on excised patches were calculated according to [19]. The solutions in pipette and in bath employed in sperm patch-clamp experiments are indicated in the figure legends.

2.2.2. Spermatogenic cells. Testis from adult CD-1 mice were used as a source of germ cells. Spermatogenic cells were obtained as described [13,14]. The dissociated cells were stored at $4\text{--}10^\circ\text{C}$ and remained healthy for at least 12 h. An aliquot of the cell suspension was placed in a recording chamber superfused with recording medium (in mM: 130 NaCl, 3 KCl, 10 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 1 NaHCO_3 , 0.5 NaH_2PO_4 , 5 Na-HEPES, 5 glucose, 0.16 amiloride, pH 7.35) at 20--

*Corresponding author. Fax: +52 (73) 172388.
E-mail: darszon@ibt.unam.mx

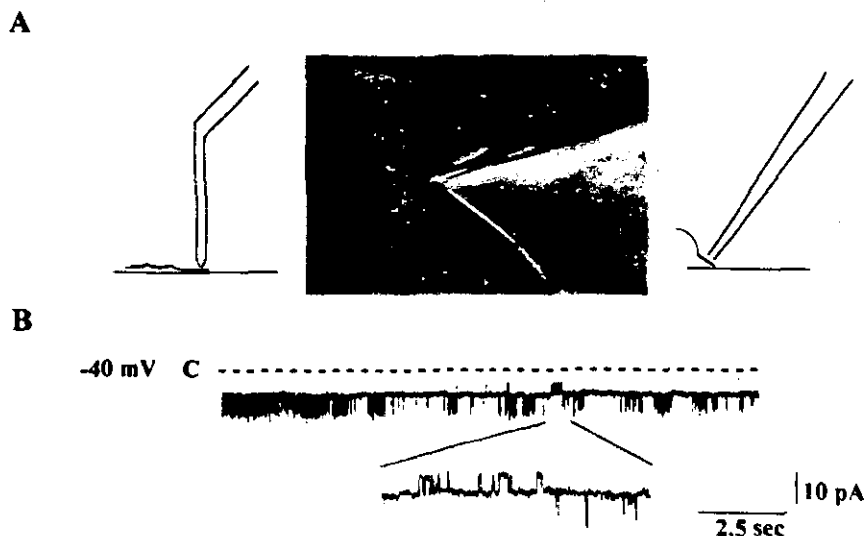


Fig. 1. Direct single channel recording in mouse sperm. A: The center shows a micro-photograph of a patch-clamped mouse sperm (head sperm width = $\sim 3 \mu\text{M}$). Schematic representations of perpendicular approaches to sperm are illustrated on both sides of the photo. B: Single channel activity in an excised patch. The pipette was filled with (in mM): 30 NF, 120 NaCl, 0.1 GABA, 10 HEPES, pH 7.2. The bath solution was (in mM): 145 NaCl, 10 MgCl_2 , 2.5 CaCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4. The trace obtained at -40 mV shows the presence of mainly two types of transitions (see text). The discontinuous line indicates zero current (C, closed state).

23°C . The solution in the pipette was (in mM): 110 Cs-Methanesulfonate, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-EGTA, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 5 Cs-HEPES, pH 7.35. Glass borosilicate pipettes were pulled to tip diameters of about $1.5 \mu\text{m}$, having resistances between 2 and 5 megaohms when filled with pipette solution. Records were low-pass filtered at 2 kHz (4-pole Bessel filter). A p/4 pulse protocol was used

routinely to minimize leak and capacitive currents from current records [20].

2.3. Membrane potential measurements

In cell attached experiments (Fig. 3) real ionic cytoplasmic concentrations are not known for the patched cell. Membrane potential (V_m)

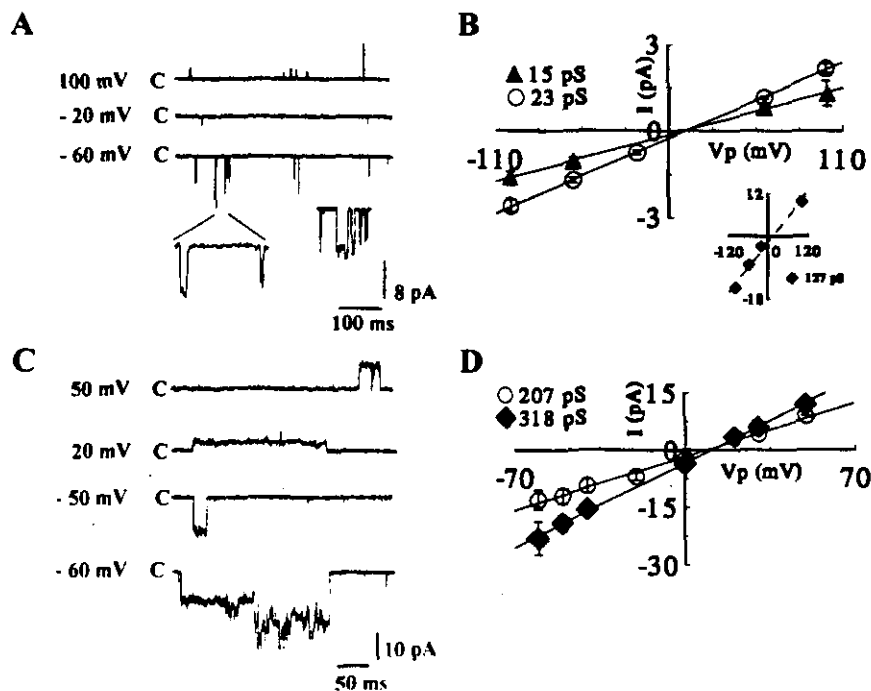


Fig. 2. Cationic channels. The traces shown in this figure were recorded on spontaneous excised patches at the indicated voltages. A fast mouse sperm cation channel displaying several conductance levels. Kinetic analysis yielded basically a monoexponential closing time constant of $0.82 \pm 0.27 \text{ ms}$ at -60 mV , and opening time constants of $4.3 \pm 1 \text{ ms}$ and $53 \pm 12 \text{ ms}$. Left inset shows a 20-fold time expansion of the indicated area of the burst at -60 mV . Right inset shows a burst from the same recording at -60 mV (identical scales). Solutions were (in mM): 145 NaCl, 2.5 CaCl_2 , 10 MgCl_2 , 10 HEPES-Na, pH 7.4 (in bath); and, 120 CsCl, 0.05 CaCl_2 , 10 EGTA-Cs, 10 HEPES-Cs, pH 7.2 (in pipette). Similar transitions were observed in 12 experiments. B: I-V relations of the channel in A, $E_{\text{rev}} = 10 \text{ mV}$. The inset shows the I-V relation of the largest conductance. C: Representative traces of a slow high-conducting channel showing two main conductance levels. Similar transitions were observed in 11 experiments. D: I-V relations of the channel in C. Solutions were (in mM): bath as in A; and in the pipette; 30 KF, 90 KCl, 0.05 CaCl_2 , 10 EGTA-K and 10 HEPES-K, pH 7.2. Smaller fast cationic transitions similar to those in A are also present.

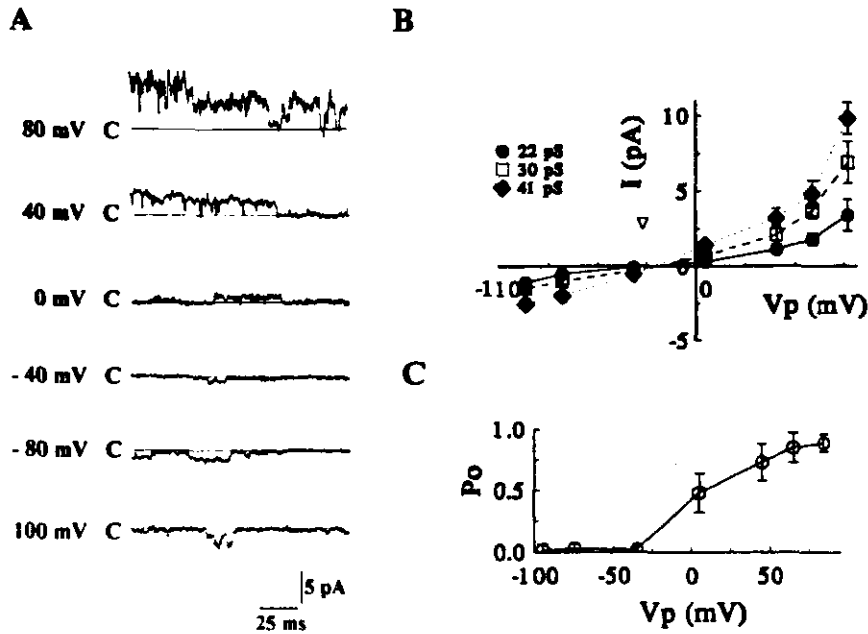


Fig. 3. Mouse sperm anion channels. A: Anion single channel transitions at the indicated pipette potentials recorded in the cell attached configuration. The pipette contained (mM): 120 NaCl, 30 NaF, 10 HEPES-Na, pH 7.6. B: I-V relations from A showing outward rectification at high positive applied potentials. Slope conductances of 22, 30 and 41 pS were measured in the linear region. E_{rev} averaged -30 ± 5 mV ($n=3$), which considering the resting potential of sperm under equivalent conditions (-85 mV, see Section 2) and 10 mM Cl^- in the sperm cytoplasm [22], indicates anion selectivity. C: Open probability (P_o) of the anion channel measured during 6.4 s at each pipette potential (V_p).

determinations in sperm suspensions were done as in [21] using DiS-C₃(5), a V_m sensitive fluorophore. The resting potential of sperm suspended in the external solution (TEA-Cl 60, TEA-MeSO₄ 70, 10 CaCl₂, pH 7.4) used for cell attached experiments was estimated to be -85 ± 7 mV ($n=8$). The internal K^+ concentration used for this calculations was 120 mM [22].

3. Results and discussion

To explore the in situ characteristics of sperm ion channels, we recorded single channel currents directly from mouse sperm. Single channel currents could be recorded in 42

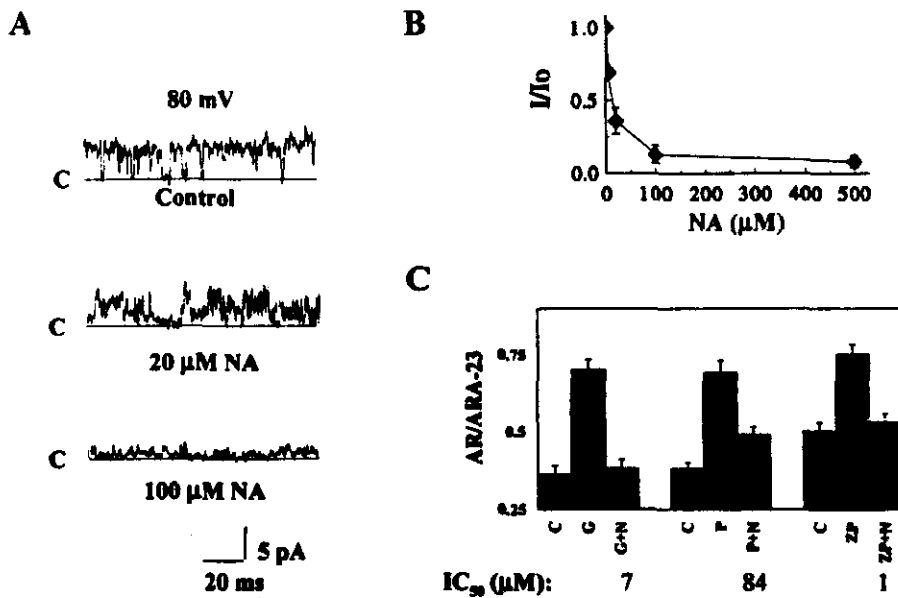


Fig. 4. Niflumic acid (NA) blocks a mouse sperm Cl^- channel and the AR induced by ZP3, GABA and progesterone. A: Conditions were as in Fig. 3. Voltage in pipette was 80 mV in all cell attached records shown. The control trace is at the top, the following traces were taken 10 min apart, after perfusing the external chamber with control solution plus 20 μ M (middle trace) or 100 μ M (lower trace) NA. B: Dose dependence of channel blockade by NA (average \pm S.E.M., $n=3$). C: NA inhibits the mouse sperm acrosome reaction (AR) induced by GABA (0.1 μ M), progesterone (45 μ M) and solubilized zona pellucida (5 ZP/ μ l). AR and its inhibition were determined as indicated in Section 2. The bars represent the average \pm S.E.M. ($n=5$) of the ratio % AR under a certain condition (C. control; G, GABA; N, NA; P, progesterone; ZP, zona pellucida) and the AR achieved with the Ca^{2+} ionophore A-23187 (ARA-23). The numbers under the bars are the IC_{50} determined in five concentration dependence experiments.

patches, 14 of which were excised patches, the remaining ones corresponding to cell attached patches. Fig. 1B shows single channel activity in an excised patch at -40 mV. Mainly, two types of current transitions can be observed: (1) fast transitions that occur in bursts; and (2) smaller upward transitions (inset below). In addition, a slow high-conducting channel similar to the one of Fig. 2C, was also observed during this recording (not shown).

Single channel currents shown in Fig. 2A were monitored in an excised patch at different applied voltages. These transitions have fast kinetics with spike shaped transitions being the most common, although square shaped transitions are also present (see record at higher resolution and the bursting period in Fig. 2A). From the I–V plots, which have an $E_{rev} = 10$ mV, a P_{Na^+}/P_{Cs^+} of 1.5 ($150 Na^+_{bath}/145 Cs^+_{pipette}$) was calculated. In a separate experiment P_{Na^+}/P_{K^+} was 0.71, indicating a permeability sequence $K^+ > Na^+ > Cs^+$, analogous to that seen in bilayers ($K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+$) for a cAMP-activated sea urchin sperm cationic channel [12]. Similar single channel currents were recorded in four excised patches and eight cell attached ones. In three experiments where transitions were recorded at various voltages, P_o did not vary significantly (0.012 ± 0.022 in the ± 100 mV range). In $\sim 25\%$ of the experiments where fast cationic transitions were seen, burst periods with $P_o > 0.3$ were observed between voltages $\geq +40$ mV or ≤ -40 mV (inset in Fig. 2A). The pattern of the transitions is also reminiscent of a mouse sperm cationic channel detected in planar bilayers [11]. Moreover, the poor selectivity of this channel suggests it could participate in the ZP induced depolarization during mouse and bull sperm AR [23].

Fig. 2C shows a record of an excised patch displaying slower cationic transitions with main conductance substrates of 207 and 318 pS ($E_{rev} = 11$ mV; $PCa^{2+}/PNa^+ = 6$; assuming $PNa^+/PK^+ = 1$). Similar transitions were recorded in 11 experiments (eight cell attached and three excised patches). Planar bilayer studies indicated the presence of a similar high conductance, poorly selective cationic channel that allows divalents through, in sea urchin [24] and mouse sperm plasma membranes [10,11]. Patch-clamp recording shows that this cation selective channel displays slow kinetics with long open times (tenths of milliseconds to seconds), resembling the behavior of the Ca^{2+} selective channel reconstituted in planar lipid bilayers.

In three experiments it was possible to record channel currents that were blocked by NA (a Cl^- channel blocker, Figs. 3 and 4). Fig. 3A shows single channel currents monitored at different applied voltages. Inspection of the records revealed the presence of open substrates with conductances of 22, 30 and 41 pS, measured in the ohmic region of the I–V relation. The reversal potential, -30 mV, is consistent with that predicted for an anion selective channel, assuming a resting potential of -85 mV (see Section 2, Fig. 3B). At more positive pipette potentials, the channel rectifies, probably due to the presence of 30 mM F^- in the pipette. Some Cl^- channels are known to have a low F^- permeability ($PF^- = 50$; [25]). P_o of the channel increases as the applied potential becomes more positive (Fig. 3C). Blockade by NA was dose-dependent ($IC_{50} = 11 \mu M$, Fig. 4A, B). Lipid bilayer studies had also shown the presence of anion channels in sea urchin [26] and mouse sperm plasma membranes [11,27].

Several reports indicate the participation of Cl^- channels in sperm physiology. NA was reported to inhibit a Ca^{2+} induced

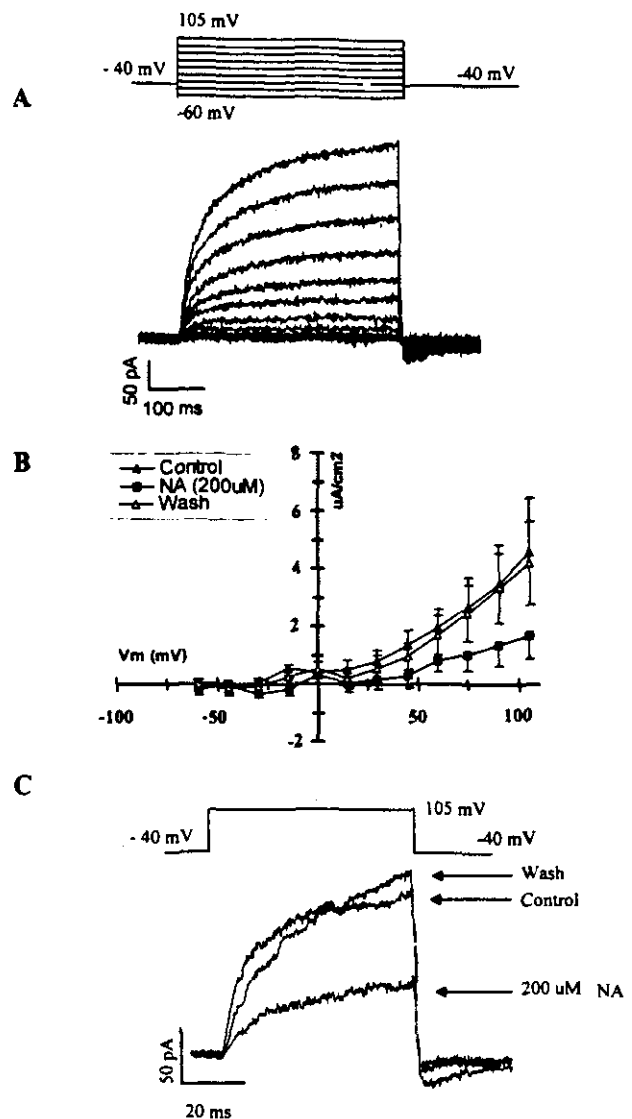


Fig. 5. NA blocks outward whole cell currents resulting from Cl^- influx in pachytene spermatocytes. Spermatogenic cells and whole-cell recordings were obtained as described in Section 2. Patch pipettes were filled with (in mM): 110 Cs-Methanesulfonate, 10 CsF, 15 CsCl, 2 Cs-EGTA, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 5 Cs-HEPES, pH 7.35; the bath solution contained (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 $MgCl_2$, 1 $NaHCO_3$, 0.5 NaH_2PO_4 , 5 Na-HEPES, 5 glucose, 10 $CaCl_2$, 0.16 amiloride, pH 7.35. Currents were triggered by depolarizations from -40 mV holding potential up to 100 mV in 15 mV steps. A: Cl^- currents elicited at 40 mV (top shows voltage protocol) and their block by 200 μM NA. B: I–V relation of the Cl^- currents in mouse pachytene spermatocytes (filled triangles), and their blockade (squares) and recovery (empty triangles) after exposure to 200 μM NA. The points represent the average of three experiments, the standard deviation was smaller than the symbols. The estimated IC_{50} was 100 μM .

hyperpolarization which is partially driven by Cl^- in mouse sperm [21]. External Cl^- , and putative $GABA_A$ -R channels have been implicated in the GABA and progesterone induced AR in human and mouse sperm [4,5,28]. In porcine and human sperm, Glycine receptor activation was reported to elicit AR [29] and Cl^- efflux [30]. In other cell systems, NA and other fenamates (non-steroidal anti-inflammatory drugs) have been shown to block Ca^{2+} -activated Cl^- channels [31,32], as well as an heterologously expressed $GABA_A$ -R [33]. More-

over. Sigel et al. (1989), reported the expression of a rat β homopentamer GABA_A-R which opens in the absence of GABA [34]. Future experiments will have to be done to determine if the sperm Cl⁻ channel reported here is of the GABA_A-R type.

Since NA blocks Cl⁻ channels in mouse sperm and in other systems, the effect of this compound was tested on the AR. NA blocked the AR induced by GABA (0.125 μ M), progesterone (45 μ M) or solubilized zona pellucida (5 ZP/ μ l) (Fig. 4C). The ZP3 and GABA induced AR was more sensitive to NA (IC₅₀ of 1 and 7 μ M, respectively) than that induced by progesterone (84 μ M). This was unexpected since it has been proposed that progesterone triggers the AR by potentiating the GABA_A-R channel [2,4,5]. This result may indicate that distinct Cl⁻ channels participate in AR induced by the different agonists. Alternatively, progesterone could modulate two different surface sperm receptors one coupled to a Ca²⁺ channel [2,35,36] and the other, a GABA_A-R type, which upon progestin binding decreases its affinity for NA [29,37].

We investigated further whether spermatogenic cells are endowed with NA sensitive Cl⁻ channels. Cl⁻ currents, activated by depolarization, and blocked by NA (IC₅₀ 100 μ M), could be monitored in pachytene spermatocytes (Fig. 5). These results show that NA sensitive Cl⁻ channels are expressed early in spermatocyte differentiation. However, at difference with anion channels present in the sperm, Cl⁻ channels in spermatocytes display a lower affinity for this blocker.

At the least, our results lead to the conclusion that mouse sperm, and spermatocytes, as early as pachytene, are endowed with Cl⁻ channels blocked by NA. Furthermore, the cumulated experimental evidence suggests that mouse sperm Cl⁻ channels may participate in the AR induced by ZP3 and GABA. It is possible that one of these Cl⁻ channels is an isoform of the GABA_A-R, and that mammalian sperm possess more than one mechanism capable of triggering the events leading to the fusion of the acrosomal vesicle.

References

- [1] Wassarman, P.M. (1990) *Development* 108, 1-17.
- [2] Blackmore, P.F., Neulen, J., Lattanzio, F. and Beebe, S.J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 18655-18659.
- [3] Foresta, C., Rossato, M. and Di Virgilio, F. (1993) *Biochem. J.* 294, 279-283.
- [4] Wistrom, C.A. and Meizel, S. (1993) *Dev. Biol.* 159, 679-690.
- [5] Roldán, E.R.S., Murase, T. and Shi, Q. (1994) *Science* 266, 1578-1581.
- [6] Shi, Q. and Roldán, E.R.S. (1995) *Biol. Reprod.* 52, 373-381.
- [7] Darszon, A., Liévano, A. and Beltrán, C. (1996) *Curr. Top. Dev. Biol.* 34, 117-163.
- [8] Cox, T., Campbell, P. and Peterson, R.N. (1991) *Mol. Reprod. Dev.* 30, 135-147.
- [9] Tiwari-Woodruff, S.K. and Cox, T.C. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, C1284-C1294.
- [10] Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P. and Liévano, A. (1994) *FEBS Lett.* 338, 232-236.
- [11] Labarca, P., Zapata, O., Beltrán, C. and Darszon, A. (1995) *Zygote* 3, 199-206.
- [12] Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A. and Darszon, A. (1996) *Dev. Biol.* 174, 271-280.
- [13] Liévano, A., Santi, C.M., Serrano, C.J., Treviño, C.L., Bellvé, A.R., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A. (1996) *FEBS Lett.* 388, 150-154.
- [14] Santi, C.M., Darszon, A. and Hernández-Cruz, A. (1996) *Am. J. Physiol.* 271, C1583-C1593.
- [15] Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. and Florman, H.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13004-13009.
- [16] Lee, M.A. and Storey, B.T. (1985) *Biol. Reprod.* 33, 235-246.
- [17] Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B., Lee, T. and Poirier, G.R. (1992) *Biol. Reprod.* 47, 716.
- [18] Ward, C.R., Storey, B.T. and Kopf, G.S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 14061-14067.
- [19] Lewis, C.A. (1979) *J. Physiol. (Lond.)* 286, 417-455.
- [20] Chen, C. and Hess, P. (1990) *J. Gen. Physiol.* 96, 603-630.
- [21] Espinosa, F. and Darszon, A. (1995) *FEBS Lett.* 372, 119-125.
- [22] Babcock, D.F. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6380-6389.
- [23] Arnoult, C., Zeng, Y. and Florman, H. (1996) *J. Cell Biol.* 134, 637-645.
- [24] Liévano, A., Vega Saenz de Miera, E.C. and Darszon, A. (1990) *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.
- [25] Bormann, J., Hamill, O.P. and Sakmann, B. (1987) *J. Physiol.* 385, 243-286.
- [26] Morales, E., de la Torre, I., Moy, G.W., Vacquier, V.D. and Darszon, A. (1993) *Mol. Reprod. Dev.* 36, 174-182.
- [27] Chan, H.C., Zhou, T.S., Fu, W.O., Shi, Y.L. and Wong, P.Y.D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 117-129.
- [28] Shi, Q.X., Yuan, Y.Y. and Roldán, E.R. (1997) *Mol. Hum. Reprod.* 3, 677-683.
- [29] Meléndez, C. and Meizel, S. (1995) *Biol. Reprod.* 53, 676-683.
- [30] Sabeur, K., Edwards, D.P. and Meizel, S. (1996) *Biol. Reprod.* 54, 993-1001.
- [31] White, M.M. and Aylwin, M. (1990) *Mol. Pharmacol.* 37, 720-724.
- [32] Korn, S.J., Bolden, A. and Horn, R. (1991) *J. Physiol. (Lond.)* 439, 423-437.
- [33] Woodward, R.M., Polenzani, L. and Miledi, R. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 806-817.
- [34] Sigel, E., Baur, R., Malherbe, P. and Möhler, H. (1989) *FEBS Lett.* 257, 377-379.
- [35] Mendoza, C., Soler, A. and Tesarik, J. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 518-523.
- [36] Llanos, M.N. and Anabalón, M.C. (1996) *Mol. Reprod. Dev.* 45, 313-319.
- [37] Majewska, M.D. (1990) in: J.E. Wiley (Ed.), *Steroid Regulation of the GABA_A Receptor: Ligand Binding Chloride Transport and Behavior*, Wiley Interscience Publication, New York, pp. 83-91.

TITLE. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca^{2+} currents of mouse spermatogenic cells, $\alpha 1\text{E}$ currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction.

AUTHORS: *Espinosa, F., *López-González, I., Serrano, C. J., Gasque, G., de la Vega-Beltrán, J. L., Treviño, C. L. and #Darszon, A. Depto. Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; Apdo. 510-3, Cuernavaca Morelos 62271, México.

*These authors contributed equally.

Correspondence should be addressed to A. Darszon. Tel (525) 6227650, Fax (5273) 172388. Email darszon@ibt.unam.mx

Running Title. Cl^- channel blockers inhibit spermatogenic Ca^{2+} channels

This work was supported by grants from: CONACyT, DGAPA, the Howard Hughes Medical Institute, and the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology to AD.

Key Words. Anion channel blockers, Ca^{2+} channels, acrosome reaction

ABSTRACT

The direct electrophysiological characterization of sperm Ca^{2+} channels has been precluded by their small size and flat shape. An alternative to study these channels is to use spermatogenic cells, the progenitors of sperm, which are larger and easier to patch-clamp. In mouse and rat, the only voltage-dependent Ca^{2+} currents these cells display are of the T-type. Since compounds that block these currents inhibit the sperm acrosome reaction (AR), it is likely that they are fundamental for this process. Other ion transport systems participate in the AR. Recent single channel recordings in mouse sperm revealed the presence of a Cl^- channel. This channel and the zona pellucida-induced AR were inhibited by niflumic acid (NA), an anion channel blocker (Espinosa et al., 1998). Since NA and other anion channel blockers modulate cationic channels as well, it became important to determine if they affect the T-type Ca^{2+} currents of spermatogenic cells. These currents were blocked in a voltage dependent manner by NA, 1,9 dideoxyforskolin (DDF), and 5-nitro-2(3-phenylpropylamine) benzoic acid (NPPB). The IC_{50} s at -20 mV were: 43 μM for NA, 28 μM for DDF, and 15 μM for NPPB. Moreover, DDF partially inhibited the ZP-induced AR (40 % at 1 μM) and NPPB displayed an IC_{50} of 6 μM for this reaction. These results indicate that NA and DDF do not inhibit the ZP-induced AR by blocking T-type Ca^{2+} currents, a possibility that remains open for NPPB. Interestingly 200 μM NA was basically unable to inhibit $\alpha 1\text{E}$ Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes, questioning that this α subunit codes for the T-type Ca^{2+} channels present in spermatogenic cells. Evidence for the presence of $\alpha 1\text{C}$ and $\alpha 1\text{G}$ in mouse pachytene spermatocytes and in round and condensing spermatids is presented.

INTRODUCTION

The acrosome reaction (AR) is an exocytotic event triggered when sperm contact the extracellular layers of the oocyte. This reaction allows sperm to penetrate and fuse with the egg (Wassarman and Litscher, 1995). Ionic fluxes are fundamental for the AR to occur, both in mammals and in marine invertebrates (reviewed in Darszon et al., 1998). The AR requires an increase in intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) which depends on external Ca^{2+} (Florman et al., 1998). Ca^{2+} channel antagonists, preclude the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and inhibit AR (Schackmann, 1989). These results demonstrate the fundamental participation of voltage dependent Ca^{2+} channels (VDCC) in the AR (Darszon et al., 1998).

The electrophysiological characterization of mammalian sperm Ca^{2+} channels has been very difficult. Sperm are tiny morphologically complex cells, unable to synthesize proteins (Hetch, 1988). Their progenitors, the spermatogenic cells, synthesize the ion channels that will end up in mature sperm. Pachytene spermatocytes and round and condensing spermatids are at the later stages of differentiation, are translationally active, and much larger than sperm, therefore easier to patch-clamp (Hagiwara and Kawa, 1984; Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996b). Transcripts for $\alpha 1E$ and to a minor extent $\alpha 1A$, subunits that code for the pore and voltage sensor of different voltage-activated Ca^{2+} channels, were found to be present in pachytene spermatocytes and in round spermatids (Liévano et al., 1996). These cells only display T-type Ca^{2+} channels (Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996). The T-type Ca^{2+} currents of spermatogenic cells are blocked by Ni^{2+} , dihydropyridines and amiloride, at concentrations that inhibit the sperm AR, which suggests they play a key role in this process (Liévano et al., 1996; Arnoult et al., 1996). Even though T-type Ca^{2+} channels from brain and heart were recently cloned (Williams et al., 1998; Cribbs et al., 1998), it is still not clear which $\alpha 1$ subunit codes for T-type Ca^{2+} channels in spermatogenic cells and other tissues (Meir and Dolphin, 1998; Piedras-Rentería et al., 1997; Piedras-Rentería and Tsien, 1998).

Cl^- channels have been implicated in the mammalian sperm AR (Wistrom and Meizel, 1993; Meizel, 1995). The first single channel recordings in mouse sperm revealed the presence of a niflumic acid (NA) sensitive Cl^- channel (Espinosa et al., 1998). Interestingly, the ZP and GABA induced AR were inhibited by similar μM concentrations of NA, suggesting the participation of this anion channel in the reaction. However, NA and other anion channel blockers (White and Aylwin, 1990; Tilman et al., 1991) have been shown to modulate diverse cationic channels both positively or negatively. For example NA increases the open probability of single channel transitions (Ottolia and Toro, 1994), and the macroscopic currents (Gribkoff et al., 1996) of heterologously expressed Ca^{2+} -dependent K^+ channels. In contrast, NMDA (Lerma and Martín del Río, 1991) and nicotinic (Séguéla et al., 1993) receptors, are negatively modulated by NA. T-type Ca^{2+} channels could also be targets of this blockers. In this study the anion channel antagonists, NA, DDF and NPPB were found to block the T-type Ca^{2+} currents of pachytene spermatocytes and the mouse sperm AR. $\alpha 1E$ channels expressed in *Xenopus* oocytes were basically insensitive to 200 μM NA. Evidence is presented for the presence of $\alpha 1C$ and $\alpha 1G$ in spermatogenic cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Essential and non essential amino acids IX, M-199, collagenase, BSA, NA, DDF were from Sigma, San Luis. Trizol, Superscript pre-amplification system, Taq DNA polymerase, 1 kb DNA ladder from GIBCO-BRL, Gaithersburg MD. Other reagents and salts were from the highest quality commercially available.

Spermatogenic cell dissociation and purification. Testis 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, IX essential and non essential amino acids, adjusted to pH 7.2 with CO_2). Spermatogenic cells for patch clamp studies were obtained by mechanical dissociation. DNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the EKRB dissociation solution (the external recording solution but depleted of Ca^{2+}) immediately before the dissociation procedure. After discarding the *tunica albuginea*, seminiferous tubules were separated using forceps under the stage of a stereoscopic microscope. Cells were extruded from the seminiferous tubules by holding one extreme of the tubule with forceps and "squeezing" the rest of the tubule in the opposite direction with another forceps. The cells were then pipetted repeatedly to separate them. The cells were dissociated and stored on ice. Spermatogenic cells remained healthy for at least 12 h. Spermatogenic cells for purification were obtained as described (Liévano et al., 1996). The resulting cell

suspension was resuspended into EKRB 0.5 % BSA and filtered through a 80 μm mesh Nytex nylon filter (Tetko Inc., Lancaster NY), and stored at 4-10 °C. 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). Gradients were collected after 2.5 hr in 10 ml fractions, and fractions were assessed for cell morphology and purity by light microscopy using Nomarski optics, and the similar fractions were pooled.

Patch-clamp of pachytene spermatocytes. An aliquot of the mechanically dissociated spermatogenic cell suspension was placed in a recording chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation) 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. All cells used in this study were at the pachytene stage of differentiation, either as single cells or symplasts (see Santi et al., 1996). Whole-cell currents were recorded with an Axopatch 1-B amplifier in the voltage clamp mode under the command of the pClamp program (Axon Instruments, Foster City, CA), connected to the pipette and the bath by Ag-AgCl wires. The composition of the pipette internal solution was (in mM: 110 Cs-Methanesulfonate, 10 CsF, 15 CsCl, 5 Cs-EGTA, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 10 Cs-Hepes, pH 7.35). Glass borosilicate pipettes were pulled to tip diameters of about 1.8 μm , having resistances ranging between 2 and 3.5 M Ω when filled with pipette solution. Records were low-pass filtered at 2 kHz (4-pole Bessel filter), digitized at 10 kHz and analyzed off-line. A p/4 pulse protocol was used routinely to minimize leak and capacitive currents from current records, and series resistance was compensated by at least 50 %. Anion channel blocker stock solutions (200 mM NA in 0.5 M NaOH; 100 mM DDF and NPPB (ICN, Costa Mesa, CA) in DMSO) were added to the recording chamber to reach the concentrations indicated in the figures, without changing pH. For each cell tested controls were recorded, then the blocker was added to the bath and 2-5 minutes later, the pulse protocol repeated and recorded. In some experiments the blocker was washed with > 50 times the chamber volume (~ 200 μl) and records obtained again. To achieve final DDF concentrations of 200 μM it was necessary to sonicate the bath solution.

AR inhibition experiments. Sperm were obtained from CD-1 mice >31/2 months killed by cervical dislocation. The cells were collected from excised epididymides and suspended (3.6X10⁶/ml) in M-199 media supplemented with 25 mM NaHCO₃, 1 mM sodium pyruvate and 0.4% BSA, were capacitated at 37 °C for 30 min in 5 % CO₂ atmosphere. Thereafter the heat-solubilized ZP was added and cells were left to acrosome react for 30 min. Inhibition was studied with the same procedure except the blocker was added 5 min prior to ZP. At the end of the experiment AR was determined by established procedures (Boettger-Tong et al., 1992). A minimum of 100 sperm were counted under light field microscopy. Results were normalized by subtracting the spontaneous AR and considering the A-23187 induced AR as 1.

Expression of recombinant $\alpha\text{1E Ca}^{2+}$ channels. Stage V and VI oocytes were surgically removed from tricaine anesthetized *Xenopus laevis* and treated for 1.5 hr with 1.5 mg/ml collagenase in Ca-free ND-96 medium (in mM ; 96 NaCl ; 2 KCl ; 1 MgCl₂ ; 5 HEPES ; 2 pyruvic acid ; pH 7.6). After recovering for 18-24 hr, oocytes were injected in the nucleus with 10 nl of cDNA coding for $\alpha\text{1E Ca}^{2+}$ channel subunit (Soong et al., 1993) at a concentration of 2.2 ng/nl (gift from Dr. Snutch). Oocytes were incubated at 17 °C for 3-5 days in ND-96 containing 1.8 mM CaCl₂ and 50 mg/ml gentamicin. Macroscopic currents were recorded at 16-18 °C with a two-electrode voltage-clamp amplifier (Dagan CA-1; Dagan Corporation). Acquisition and data analysis were performed using pClamp (v6.0) software (Axon Instruments). Leak currents were subtracted using a P/4 protocol. Voltage and currents electrodes (0.3-2 M Ω tips resistance) were filled with 1 M KCl, 1 mM EGTA and 10 mM HEPES (pH 7.4). Oocytes were placed in a 500 μl recording chamber and whole cell currents were measured with Ba²⁺ in the external solution (in mM ; 10 BaCl₂ ; 1 KOH ; 110 NaOH ; 10 HEPES ; titrated to pH 7.2 with methane sulfonic acid). To minimize kinetic contamination by endogenous Ca²⁺ activated Cl⁻ currents, oocytes were injected with 50 nl of a BAPTA solution (in mM; 10 BAPTA, 10 HEPES, titrated to pH 7.2 with CsOH) 1-1.5 hr prior to the experiment (Parent et al., 1997). Voltage pulses were applied from a holding potential of -90 mV at 10 mV steps until +40 mV. Data were sampled at 10 KHz and filtered at 1 KHz.

For blockage experiments, the chamber solution was changed, superfusing with 14-40 times the chamber volume, with the 10 mM Ba²⁺ solution containing 200 μM NA or 20 μM nifedipine, and incubating 5-7 minutes before recording.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA from seminiferous tubules and purified spermatogenic cells were extracted with Trizol reagent. Prior each reverse transcription (RT), 5 μ g of each total RNA were dissolved in 10 μ l water and digested with 1 U RNase-free DNase (RQ1, Promega Co., Madison) in the transcription buffer (in mM: 50 KCl, 2.5 MgCl₂, Tris-Cl 20, pH 8.4) for 10 min at 37 °C, and the DNase was heat inactivated at 65°C for 15 min. At this point, random hexamers were added to a final concentration of 12.5 ng/ μ l, and quickly chilled on ice. RT was achieved with the Superscript pre-amplification system, 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 1C, forward (5'-GCGAATTACNGGNGARGAYTGGAAY) and reverse (5'-GCGGATCCCATYTCNGGYTCYTCYTCRTC), and α 1G, forward (5'-CGG GATCCAATAAGGACTGACTCCCTGGA) and reverse (5'-CCCAAGCTTGGTGGGCTGAG TTTTCTTA) Ca²⁺ channel subunits. Amplifications were performed on a Mastercycler 5330 programmable thermal controller (Eppendorf) with Taq DNA polymerase. PCR reactions were carried out at a final volume of 50 μ l having 200 μ M dNTP, 0.25 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 per reaction. Program was for α 1C 94°C 5 min, and cycling as follows, denaturation at 94° for 45 sec, annealing at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 2 min, during 35 cycles and for α 1G 94°C 5 min, and cycling as follows, denaturation at 94° for 45 sec, annealing at 55 °C for 90 sec, extension at 72 °C for 1 min, during 40 cycles. Amplimer identity was obtained by direct double-strand sequencing of the gel purified fragment using the Termostaq kit (Amersham), according to the supplier's instructions.

RESULTS

Anion channel blockers inhibit T-type Ca²⁺ currents. Whole-cell recordings were obtained on mechanically dissociated mouse spermatogenic cells. As previously reported in rat (Hagiwara and Kawa, 1984) and mouse (Lievano et al., 1996; Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996), T-type currents were the only voltage dependent Ca²⁺ currents these cells display. T-type Ca²⁺ currents are classified as low voltage activated Ca²⁺ currents with fast inactivation kinetics (Santi et al., 1996). Accordingly, T-type Ca²⁺ currents were elicited upon ~125 ms depolarizations from a holding potential of -90 mV to potentials between -70 and +40 mV, using 10 mV increments. Peak currents were measured before and after adding the anionic channel blocker. Figure 1A depicts T-type Ca²⁺ currents obtained by depolarizing to -20 mV before, after exposure to 100 μ M NA, and posterior to washing the blocker. This concentration of NA completely blocked the Ca²⁺ current. Current recovery after washing was partial for the blockers tested. Part B of this figure shows the complete I-V curves for the three conditions described above. Control currents at -20 mV are stable for at least 30 min (fig. 1C), ruling out current washout as a source of current reduction.

Figure 2 shows concentration curves for T-type Ca²⁺ current blockade by NA, DDF and NPPB. NA and DDF inhibited peak current (I_{max}) at -20 mV with IC₅₀s of 43 μ M and 28 μ M, respectively (fig. 2A, B). NPPB seems to have two different binding sites, I_{max} decreased reaching a plateau at 45 % inhibition between 0.5 to 10 μ M, higher concentrations increased blockage reaching 100 % at 100 μ M (fig. 2C).

Figure 3 illustrates the voltage-dependent blockade by these anion channel blockers (ACBs). At low voltages the T-type Ca²⁺ currents from spermatogenic cells are poorly blocked. More depolarized potentials enhance blockage. For example, at -50 mV 50 μ M DDF blocked 34 % of the current while at +10 mV the block was 76 %.

DDF and NPPB inhibit the ZP-induced acrosome reaction. It was previously reported that NA blocks a Cl⁻ channel (IC₅₀ = 11 μ M) and the ZP (IC₅₀ = 1 μ M) induced AR with similar affinities (Espinosa et al., 1998). Since it is shown here that T-type Ca²⁺ currents are sensitive to ACBs, their blockage could explain why NA inhibits the sperm AR. Therefore, it was important to compare the potency of these ACBs to inhibit the AR induced by ZP, with their ability to block T-type Ca²⁺ channels.

DDF only partially inhibits the mouse sperm ZP-induced AR (fig. 4A). At 1 μ M it inhibits ~45 % of the AR, higher concentrations seem to damage the cells. On the other hand, NPPB inhibited AR with an IC₅₀ of ~6 μ M (fig. 4B).

Significantly smaller concentrations of NA and DDF were required to inhibit the ZP-induced AR than to block T-type Ca²⁺ currents from spermatogenic cells. Therefore, these two compounds do not inhibit AR blocking

these VDCCs. However, NPPB can partially block T-type Ca^{2+} currents at lower concentrations than NA and DDF (40 % at $\sim 1 \mu\text{M}$). Thus, it could inhibit AR by blocking these Ca^{2+} channels.

$\alpha 1\text{E}$ Ba^{2+} currents expressed in *Xenopus* oocytes are very mildly sensitive to niflumic acid. Even though currently under active debate, the $\alpha 1\text{E}$ gene has been considered one of the candidates to code for the T-type Ca^{2+} channel pore subunit (Soong et al., 1993; Liévano et al., 1996; Ertel and Ertel, 1997). To further test this proposal cDNA coding for the $\alpha 1\text{E}$ Ca^{2+} channel subunit from rat brain was expressed in *X. laevis* oocytes. Figure 5 shows Ba^{2+} currents elicited by a depolarization from a holding potential of -90 mV to 10 mV in the absence and presence of 200 μM NA. It turns out that $\alpha 1\text{E}$ expressed Ba^{2+} currents were basically insensitive to NA. Only a 7 % blockage was seen with 200 μM of this compound, a concentration which totally inhibits T-type Ca^{2+} currents in spermatogenic cells. This result questions the possibility that $\alpha 1\text{E}$ codes for T-type Ca^{2+} channels in spermatogenic cells.

Initially, the findings of Soong et al (1993) showing that $\alpha 1\text{E}$ expressed in *X. laevis* oocytes yielded currents insensitive to 10 μM nifedipine was consistent with the fact the T-type Ca^{2+} currents were believed to be insensitive to dihydropyridines (Hess, 1990). However, it is now known that T-type Ca^{2+} currents are sensitive to μM dihydropyridines in some cells (Liévano et al., 1995), and for sure in spermatogenic cells (Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996; Arnoult et al; 1996, 1998). Experiments done with 20 μM nifedipine corroborated the insensitivity of $\alpha 1\text{E}$ expressed Ca^{2+} currents in *Xenopus* oocytes to this blocker (not shown). A straightforward explanation would be that T-type Ca^{2+} currents of spermatogenic cells are not driven through $\alpha 1\text{E}$ coded channels nevertheless, other explanations are possible (see discussion).

Both $\alpha 1\text{C}$ and $\alpha 1\text{G}$ are present in spermatogenic cells. The work by Liévano et al. (1996) on the $\alpha 1$ subunits present in spermatogenic cells was done with probes to the $\alpha 1$ subunits known at the time. Then, the only $\alpha 1$ subunit which under certain conditions displayed some similarities to T-type Ca^{2+} currents was $\alpha 1\text{E}$. Recently a new $\alpha 1$ subunit named G was cloned from brain which when expressed yields Ca^{2+} currents with T-type characteristics (Pérez-Reyes et al., 1998a). This finding and the results described in the previous section motivated the authors to determine if $\alpha 1\text{G}$ was present in spermatogenic cells, and to use a more sensitive assay to detect $\alpha 1\text{C}$.

Fig 6 illustrates the electrophoretic pattern of the amplimers obtained in the RT-PCR experiments using specific oligonucleotides for $\alpha 1\text{G}$. It was possible to amplify a fragment of the expected size in mouse brain, testis, pachytene spermatocytes, and round and condensing spermatids. The amplimer identity was confirmed by double-strand sequencing. These experiments show that $\alpha 1\text{G}$ is expressed during the last stages of spermatogenesis.

To test again for the presence of $\alpha 1\text{C}$ with a more sensitive assay, RT-PCR analysis was performed with a different set of degenerate oligonucleotides than previously used (Liévano et al., 1996). A single band of the expected size was obtained for mouse brain cDNA. This amplimer was sequenced and determined to be a fragment from $\alpha 1\text{C}$. For testis and spermatogenic cells only a smear around the expected size was observed. These smears were blotted and probed with the brain ^{32}P -labeled amplimer (Sambroock, et al., 1989). A sharp signal was obtained in testis and spermatogenic cells indicating the expression, although low, of $\alpha 1\text{C}$ in these cells.

DISCUSSION

Micromolar NA was found to inhibit the ZP-induced AR and single anion channel transitions in mouse sperm (Espinosa et al., 1998). NA and other compounds like NPPB and DDF, are considered blockers of anion channels. They block Ca^{2+} activated Cl^- channels (Baron et al., 1991; Cotton et al., 1997; Lamb et al., 1994), the CFTR Cl^- channel (Walsh and Wang, 1993; Doughty et al., 1998), osmotically regulated Cl^- channels (Diener et al., 1996), and an inward rectifying Cl^- channel studied in *C. elegans* spermatocytes (Machaca et al., 1996). However these compounds also affect some cation channels such as: the NMDA-R (Lerma and Martín del Rio, 1991), non selective cation channels (Gógelein et al., 1990), and VDCCs (Walsh and Wang, 1993; Doughty et al., 1998). Additionally, NA and NPPB can increase macroscopic currents of K^+ channels expressed in *Xenopus* oocytes (Gribkoff, et al., 1996) and the open probability of Ca^{2+} channels reconstituted in planar bilayers (Ottolia and

Toro, 1994). The neuronal GABA_A-R, itself a channel, is potentiated at low NA concentrations and inhibited at high concentrations (Woodward et al., 1994).

The only type of voltage-dependent Ca²⁺ currents found in mouse spermatogenic cells are of the T-type (Liévano et al., 1996; Santi et al., 1996; Arnoult et al., 1996). These channels are probably still present in mature sperm since they are unable to synthesize proteins. The T-type Ca²⁺ channels from spermatogenic cells and the sperm AR are inhibited by similar concentrations of dihydropyridines and other blockers. These observations strongly suggest that T-type Ca²⁺ channels play a fundamental role in the sperm AR (Liévano et al., 1996; Arnoult et al., 1996, 1998).

Since NA inhibited the mouse sperm AR, it seemed important to determine if T-type Ca²⁺ currents from spermatogenic cells were sensitive to this blocker. NPPB and DDF were also tested. The three compounds blocked these Ca²⁺ currents with IC50s of: NA 43 μM, DDF 28 μM and, as seen in fig. 2C, NPPB appears to have two distinct binding sites with approximate affinities of 25 nM and 75 μM. In contrast, the ZP-induced sperm AR was more sensitive to these blockers, with IC50s (μM) of: NA (1) (Espinosa et al., 1998), DDF (1) and NPPB (6) (fig. 4). These results indicate that it is unlikely that T-type Ca²⁺ channels are involved in the inhibition of the ZP-induced AR caused by NA and DDF, and suggest that other channels, possibly anionic, may influence this reaction. Only in the case of the high affinity binding site for NPPB could T-type Ca²⁺ channel blockade contribute to AR inhibition.

Blockade of the T-type Ca²⁺ currents from spermatogenic cells by NA, DDF and NPPB was voltage dependent, being higher at positive potentials (fig. 3). Several reports suggest a direct interaction of these blockers with either anion or cation channels (Gögelein et al., 1990; Oba et al., 1997; Ottolia and Toro, 1994; Tilman et al., 1993; White and Aylwin, 1991). The binding site could be within the pore (Evoniuk and Skolnick, 1988) and possibly reached only from one side of the membrane (Tilman et al., 1993). In order to feel the voltage, the blocker binding site must be inside the membrane (Hille, 1992). Thus, these compounds may directly interact within the pore of T-type channels. NPPB could be acting elsewhere since it displays two binding sites.

Although there is no precedent at this time, instead of directly binding to the pore of T-type Ca²⁺ channels, these blockers could interact with channel accessory subunits. Alternatively, the ACBs may exert an indirect effect over T-type Ca²⁺ currents. For instance, some models suggest the direct interaction between cation and anion channels (Kanli and Norderhus, 1998; Sonders and Amara, 1996). So far no direct interaction between Cl⁻ and VDCCs has been documented, making it unlikely that the inhibition of T-type Ca²⁺ currents of spermatogenic cells by ACBs is due to Cl⁻ channel inhibition.

ACBs are membrane permeable and could also affect enzymatic pathways that may influence ion channels function. ACBs used in this work also inhibit: cyclooxygenases and lipoxygenases that participate in arachidonic acid metabolism (Egan et al., 1978; Civelli et al., 1991), and the 3α-hydroxysteroid dehydrogenase involved in sex steroid metabolism (Penning et al., 1985). Metabolites of the lipoxygenase, and cyclooxygenase pathways positively modulate cation and anion channels (Diener et al., 1996; Kanli and Norderhus, 1998). Intracellular Ca²⁺ increases and Ca²⁺ currents can be modulated negatively (by estradiol (Nakajima et al., 1995)) or positively (by testosterone or progestins (Takeuchi and Guggino, 1996; Bukusoglu and Sarlak, 1996)). In addition to their known genomic actions, steroid hormones could modulate VDCCs on spermatogenic cells that might be critical for their differentiation. Further investigation is needed to evaluate the possible co-modulation (direct or through shared transduction pathways) of T-type Ca²⁺ channels and Cl⁻ channels of spermatogenic cells.

α1E expressed currents in *Xenopus* oocytes are very weakly sensitivity to NA.

Voltage dependent Ca²⁺ channels have been classified according to their voltage-threshold of activation as high (HVA) or low voltage-activated (LVA). HVA Ca²⁺ currents were subclassified as L, N, P or Q; and LVA Ca²⁺ currents as R or T (Tabares and López-Barneo, 1996). VDCCs are constituted by the α1, α2δ, β, and γ subunits. The α1 subunit contains the pore and the voltage sensor (Catterall, 1995). Several genes coding for α1 subunits have been cloned (A, B, C, D, E, G, H, I and S). Their heterologous expression has revealed for instance that L-type currents are coded by α1S, α1C and α1D. In contrast, the molecular identity of T-type currents in different tissues is yet under debate (Ertel and Ertel, 1997). A rat α1E clone expressed in *Xenopus* oocytes yielded Ca²⁺ channels exhibiting functional properties compatible to those of low-voltage-activated Ca²⁺ channels (Soong et al., 1993; Stephens et al., 1997), while other clones display characteristics closer to R-type Ca²⁺ currents, which are HVA (Ertel and Ertel, 1997). In addition, depending on the cell type, antisense oligonucleotides against α1E inhibited both T-type currents (Piedras-Rentería et al., 1997) and R-type currents (Piedras-Rentería and Tsien,

1998). On the other hand, Meir and Dolphin (1998) found that expression of $\alpha 1B$, E or C in COS7 cells, which do not display endogenous Ca^{2+} channel subunits or Ca^{2+} channels, can yield low conductance, low-voltage-activated Ca^{2+} channels whose voltage-dependence, and kinetics of activation and inactivation makes them indistinguishable from native T-type Ca^{2+} channels. These apparently conflicting observations reveal the necessity of establishing which $\alpha 1$ subunit codes for the T-type Ca^{2+} currents of spermatogenic cells that appear to be crucial for the mouse sperm AR.

The most prevalent $\alpha 1$ transcript of VDCC in spermatogenic cells so far is type E (Liévano et al., 1996). Therefore, a rat brain $\alpha 1E$ clone was expressed in *X. laevis* oocytes, and its sensitivity to NA determined. The expressed currents were essentially insensitive to 200 μM NA which completely blocks T-type Ca^{2+} currents of spermatogenic cells. This result questions the possibility that $\alpha 1E$ codes for the T-type currents, though alternative explanations must be considered.

ACBs different from those used here, inhibited Ca^{2+} activated Cl^- currents in smooth muscle cells, where the $[Ca^{2+}]_i$ increase driven through T-type channels was not affected (Baron et al., 1991). There are contrasting findings on the effect of ACBs on other VDC currents. In some reports L-type currents were inhibited by μM ACBs (Asai et al., 1996; Doughty et al., 1998; Walsh and Wang, 1996) but in others, they were insensitive up to 100 μM (Cotton et al., 1997; Lamb et al., 1994). The differential sensitivity to ACBs could be due to the fact that L-type Ca^{2+} currents can be coded by three different $\alpha 1$ subunits (S, C, or D). It is thus still possible that sequence variations between the rat brain $\alpha 1E$ and that of mouse spermatogenic cells, explain the lack of sensitivity to NA. In addition, subunits other than $\alpha 1$ that constitute VDCCs can modify their affinity for blockers (Varadi et al., 1995; Gurnett et al., 1997).

Another result inconsistent with $\alpha 1E$ coding for T-type Ca^{2+} channels is the inability of nifedipine at 10 μM to block $\alpha 1E$ expressed currents in *Xenopus* oocytes (Soong et al., 1993). Even 20 μM of nifedipine tested in this work did not block these currents.

Detection of $\alpha 1C$ and $\alpha 1G$ in spermatogenic cells.

Recently Pérez-Reyes et al. (1998a) cloned a novel $\alpha 1$ subunit named $\alpha 1G$. Expression of this subunit in *Xenopus* oocytes yielded Ca^{2+} currents with the properties expected of T-type currents. Moreover, $\alpha 1H$ and $\alpha 1I$ are two newly cloned $\alpha 1$ subunits belonging to what may be a family of $\alpha 1$ subunits coding for T-type Ca^{2+} currents (Cribbs et al., 1998., Pérez-Reyes et al., 1998b). These reports and the lack of sensitivity to nifedipine and NA of the heterologously expressed $\alpha 1E$ channel, prompted a search for $\alpha 1G$ in spermatogenic cells. RT-PCR experiments indicate the presence of $\alpha 1G$ in mouse pachytene spermatocytes and in round and condensing spermatids. A more sensitive assay than that used previously (Liévano et al., 1996), allowed the detection of low levels of $\alpha 1C$ mRNA, too. The presence of a rat cardiac muscle related $\alpha 1C$ in mouse sperm (Goodwin et al., 1997) and in spermatogenic cells (Goodwin et al., 1998) had been reported. Which of these subunits codes for the T-type Ca^{2+} currents in spermatogenic cells? Why do spermatogenic cells express different $\alpha 1$ subunits if only T-type currents are functionally expressed? These are interesting and fundamental questions that remain to be answered.

Acknowledgments:

The authors thank T. Snutch for the $\alpha 1E$ clone, J. Alvarez-Leefmans and H. Pasantes for anion channel blockers, and E. Mata for help with mice.

LEGENDS

Figure 1. Niflumic acid (NA) blocks T-type Ca^{2+} currents in spermatogenic cells. Mouse spermatogenic cells were mechanically obtained and whole cell currents recorded in pachytene spermatocytes as described in Methods. A) Representative traces of currents obtained applying pulses to -20 mV from a holding potential of -90 mV in the absence (Control) and presence of 100 μM NA (NA), and after washing the blocker (Wash). B) I-V curves of control (filled circles), 100 μM NA, (closed triangles), and recovery after blocker removal (open circles). Current density was obtained dividing the peak current at each voltage by the capacitance (Santi et al., 1996). C) Time stability of peak T-type Ca^{2+} currents at -20 mV. Results are averages \pm S.E.M., n= 4.

Figure 2. Dose-response curves of peak T-type Ca^{2+} current blockade in individual pachytene spermatocytes or spermatids by anion channel blockers. Peak currents were normalized with respect to the control. IC50s for NA (A)

and DDF (B) were 43 μM and 28 μM respectively. NPPB (C) appears to have two different binding sites with apparent affinities of 25 nM and 75 μM . Results are averages \pm S.E.M., $n = 4$.

Figure 3. Blockage by (A) NA (60 μM), (B) DDF (50 μM) and (C) NPPB (25 μM) is voltage dependent. Results are the averages of the normalized peak T-type Ca^{2+} currents of individual pachytene spermatocytes or symplasts as a function of applied voltage. Results are averages \pm S.E.M., $n = 4$.

Figure 4. DDF (A) and NPPB (B) inhibit the mouse sperm AR induced by solubilized zona pelucida (5 ZP/ml). AR and its inhibition were determined as indicated in Methods. The bars indicate the mean \pm S. E. M. $n \geq 3$. Results were normalized considering the A-23187 induced AR as 1 and the spontaneous AR subtracted.

Figure 5. Expression of $\alpha 1\text{E}$ in *Xenopus* oocytes yields macroscopic Ba^{2+} currents basically insensitive to niflumic acid (NA). Oocytes were nuclear injected with ~ 2 ng cDNA coding for the $\alpha 1\text{E}$ subunit. Part A shows representative current traces evoked at test pulses of +10 mV (pulse protocol shown above), before (control) and after exposing the oocyte to 200 μM NA. B. I-V curves for each cell before (dashed line) and after exposure to 200 μM NA (continuous line) were normalized to the current evoked at +20 mV and then averaged. Error bars represent S.E.M.; $n = 5$.

Figure 6. RT-PCR experiments showing the expression of Ca^{2+} channel $\alpha 1\text{G}$ subunit in brain (lane 2), testis (lane 3), pachytene spermatocytes (lane 4), round (lane 5) and condensing (lane 6) spermatids, and the reaction without cDNA (lane 7). One kb DNA ladder (lane 1). Amplicon sizes were ~ 460 bp.

REFERENCES:

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM (1996): 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, Villaz M, Florman H (1998): Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 53:1104-1111.
- Asai T, Pelzer S, McDonald TF (1996): Cyclic AMP-independent inhibition of cardiac calcium current by forskolin. *Mol Pharmacol* 50:1262-1272.
- Baron A, Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J, (1991): Pharmacological block of Ca^{2+} -activated Cl^- current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Eur J Physiol* 419:553-558.
- Boettger-Tong H, Aarons D, Biegler B, Lee T, Poirier GR (1992): Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding. *Biol Reprod* 47:716-722.
- Bukusoglu C, and Sarlak F (1996): Pregnenolone sulfate increases intracellular Ca^{2+} levels in a pituitary cell line. *Eur J Pharmacol* 29:79-85.
- Catterall W (1995): Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64:493-531.
- Civelli M, Vigano T, Acerbi D, Caruso P, Giossi M, Bongrani S, Folco GC (1991): Modulation of arachidonic acid metabolism by orally administered morniflumate in man. *Agents Actions* 33: 34-239.
- Cotton KD, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD (1997): Ca^{2+} current and Ca^{2+} -activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. *J Physiol (Lond)* 505:121-131
- Cribbs LL, Lrr JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Pérez-Reyes E (1998): Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F (1998): Ion channels in sperm physiology. *Phys Rev* in press.
- Diener M, Bertog M, Fromm M, Scharrer E (1996): Segmental heterogeneity of swelling-induced Cl^- transport in rat small intestine. *Eur J Physiol* 432: 293-300.
- Doughty JM, Miller AL, Langton PD (1998): Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel. *J Physiol (Lond)* 507:433-439.
- Egan RW, Humes JL, Juehl Jr FA (1978): Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase. *Biochemistry* 17:2230-2234.
- Ertel SI, Ertel EA (1997): Low-voltage-activated T-type Ca^{2+} channels. *Trend Pharmacol Sci* 18:37-42.
- Espinosa F, De la Vega-Beltrán JL, López-González I, Delgado R, Labarca P, Darszon A (1998). Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl^- channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 426:47-51.
- Evoniuk G, Skolnick P (1988): Picrate and niflumate block anion modulation of radioligand binding to the γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex. *Mol Pharmacol* 34:837-842.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole C (1998): A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 59:12-16.
- Gögelein H, Dahlem D, Englert HC, Lang HJ (1990): Flufenamic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Letters* 1:79-82.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Mandel FS, Pergolizzi RG, Benoff S (1997): Isolation and characterization of the primary structure of testis-specific L-type calcium channel: implications for contraception. *Mol Hum Reprod* 3:255-268.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Cooper GW, Pergolizzi RG, Benoff S (1998): Alternative splicing of exons in the alpha 1 subunit of the rat L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol Hum Reprod* 4:215-226.
- Gribkoff VK, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett J E, Kozlowski ES, Romine JL, Trojnacki JT, McKay MC, Zhong J, Dworetzky SI (1996): Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol. Pharmacol*, 50:206-217.
- Gurnett CA, Felix R, Campbell KP (1997): Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ and α_1 subunits. *J Biol Chem* 272:18508-18512.

- Hagiwara N, Kawa K (1984): Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol Lond* 356:135-149.
- Hess P (1990): Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci* 13:337-356.
- Hetch NB (1988): Post meiotic gene expression during spermatogenesis. In: Haseltine FP and First NL (eds): "Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis". New York, Liss, 267 p. 291.
- Hille B (1992): "Ionic channels of excitable membranes", (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Kanli H, Norderhus E (1998): Cell volume regulation in proximal renal tubules from trout (*Salmo trutta*). *J Exp Biol* 201:1405-1419.
- Lamb FS, Volk KA, Shibata EF (1994): Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ Res* 75:742-750.
- Lerma J, Martín del Río R (1991): Chloride transport blockers prevent n-methyl-D-aspartate receptor-channel complex activation. *Mol Pharmacol* 41:217-222.
- Liévano A, Bolden A, Horn R (1995): Calcium channels in excitable cells: divergent genotypic and phenotypic expression of $\alpha 1$ -subunits. *Am J Physiol* 36:C411-C424.
- Liévano A, Santi CM, Serrano CJ, Treviño CL, Bellvé AR, Hernández-Cruz A, Darszon A (1996): T-type Ca^{2+} channels and $\alpha 1\text{E}$ expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 388:150-154.
- Machaca K, DeFelice LJ, L'Herault SW (1996): A novel chloride channel localizes to *Caenorhabditis elegans* spermatid and chloride channel blockers induce spermatid differentiation. *Dev Biol* 176:1-16.
- Meir A, Dolphin C (1998): Known calcium channel $\alpha 1$ subunits can form low threshold small conductance channels with similarities to native t-type channels. *Neuron* 20:341-351.
- Meizel S (1997): Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 56:569-574.
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y (1995): 17 β -estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 294:625-635.
- Oba T (1997): Niflumic acid differentially modulates two types of skeletal ryanodine-sensitive Ca^{2+} -release channels. *Am J Physiol* 42:C1588-C1595.
- Ottolia M, Toro L (1994): Potentiation of large conductance K^{+} channels by niflumic, flufenamic and mefenamic acids. *Biophys J* 67:2272-2279.
- Parent L, Schneider T, Moore CP, Tawlar D (1997): Subunit regulation of human brain $\alpha 1\text{E}$ calcium channel. *J Membrane Biol* 160:67-70.
- Penning TM, Sharp RB, Krieger NR (1985): Purification and properties of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem* 260: 15266-15272.
- Pérez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee J-H (1998a): Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature (Lond)* 391:896-900.
- Pérez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Yang J, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee J-H (1998b): Molecular characterization of T-type calcium channels. In: Nargeot J, Clozel J-P and Tsien RW (eds): "T-type calcium channels." Chester, UK: Adis Press, pp 290-305.
- Piedras-Rentería ES, Chen C, Best P (1997): Antisense oligonucleotides against rat brain $\alpha 1\text{E}$ DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14936-14941.
- Piedras-Rentería ES, Tsien RW (1998): Antisense oligonucleotides against $\alpha 1\text{E}$ reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7760-7765.
- Sambrooch J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): "Molecular cloning, a laboratory manual." 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santi CM, Santos T, Hernández-Cruz A, Darszon A (1996): Properties of a novel pH-dependent Ca^{2+} permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mouse sperm function. *J Gen Physiol* 112:33-53.
- Stephens GJ, Page KM, Burley JR, Berrow NS, Dolphin AC, (1997): Functional expression of rat brain cloned $\alpha 1\text{E}$ calcium channels in COS-7 cells. *Eur J Physiol* 433, 523-532.
- Schackmann, 1989. Ionic regulation of the sea urchin sperm acrosome reaction and stimulation by egg-derived peptides. In Schatten H and Schatten G (eds): "The cell biology of fertilization". San Diego, CA: Academic Press, 1989, pp. 3-28.
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993): Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.
- Sonders MS, Amara SG (1995): Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* 6:294-302.
- Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel S, Vincent RR, Snutch TP (1993): Structure and function of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260:1133-1136.
- Tabares L, López-Barneo J (1996): Canales de Calcio. In Latorre R, López-Barneo J, Bezanilla F, Llinás R (eds): "Biofísica y Fisiología Celular". Sevilla: Universidad de Sevilla. pp. 313-330.
- Takeuchi K, Guggino SE (1996): 24R,25-(OH) $_2$ vitamin D $_3$ inhibits 1 α ,25-(OH) $_2$ vitamin D $_3$ and testosterone potentiation of calcium channels in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 271:33335-33343.
- Tilman M, Kurzelmann K, Fröbe U, Cabantchik I, Lang HJ, Englert HC, Greger (1991): Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Eur J Physiol* 418:556-563.
- Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A (1995): Molecular determinants of Ca^{2+} channel function and drug action. *Trends Pharmacol Sci* 16:43-49.
- Walsh KB, Wang C (1993): Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L-type calcium currents. *Cardiovas Res* 32:391-399.
- Wassermann PM, Litchner ES (1995): Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Top Dev Biol* 30:1-19.
- White M, Aylwin M (1990): Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 37:720-724.
- Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Phillipson, LH, Miller RJ, Johnson EC, Jarpold MM, Ellis, SB (1998): Structure and functional characterization of neuronal $\alpha 1\text{E}$ Calcium channel subtypes. *J Biol Chem* 269:22347-22357
- Wistrom CA, Meizel S (1993): Evidence suggesting involvement of a unique human steroid receptor/ Cl^{-} channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 159:679-690.
- Woodward RM, Polenzani L, Mileti R (1994): Effects of fenamates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat brain GABA $_A$ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Therap* 268:806-817.

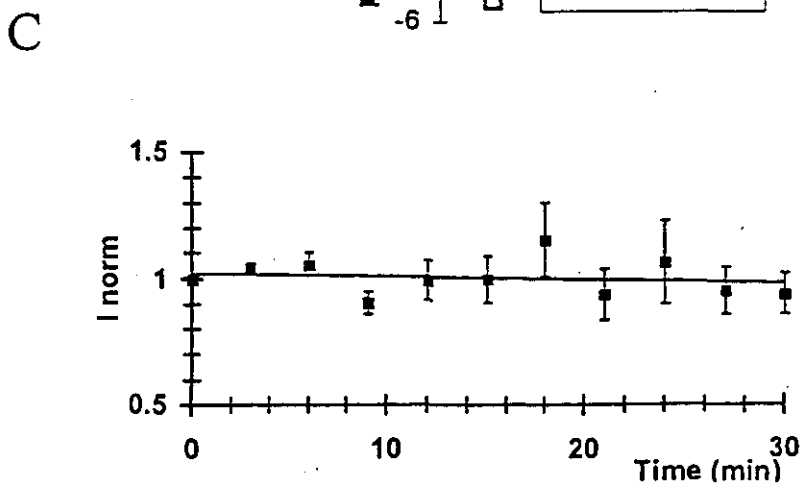
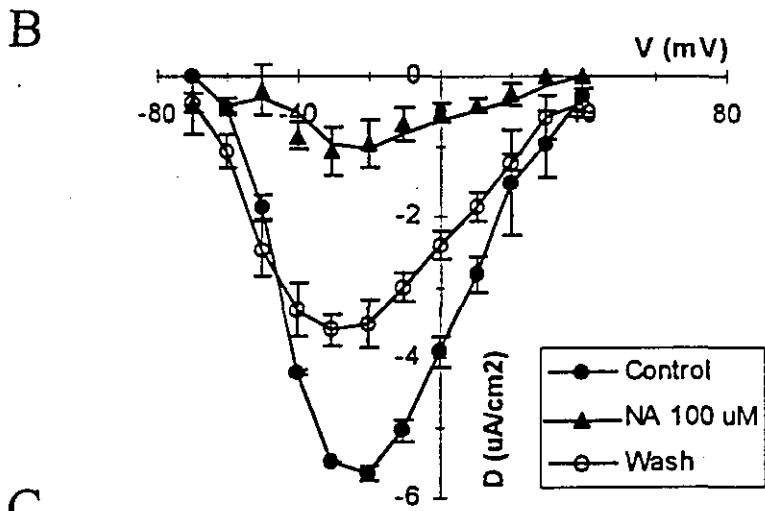
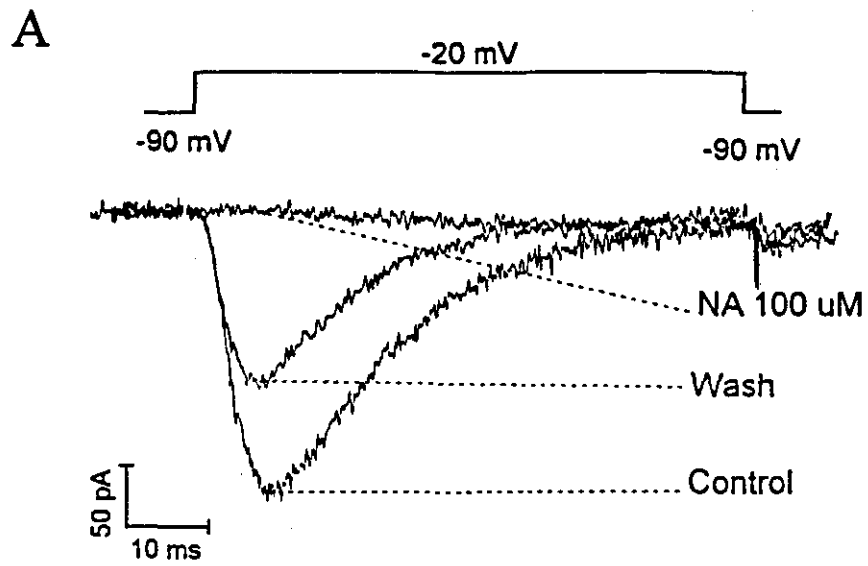


Figure 1.

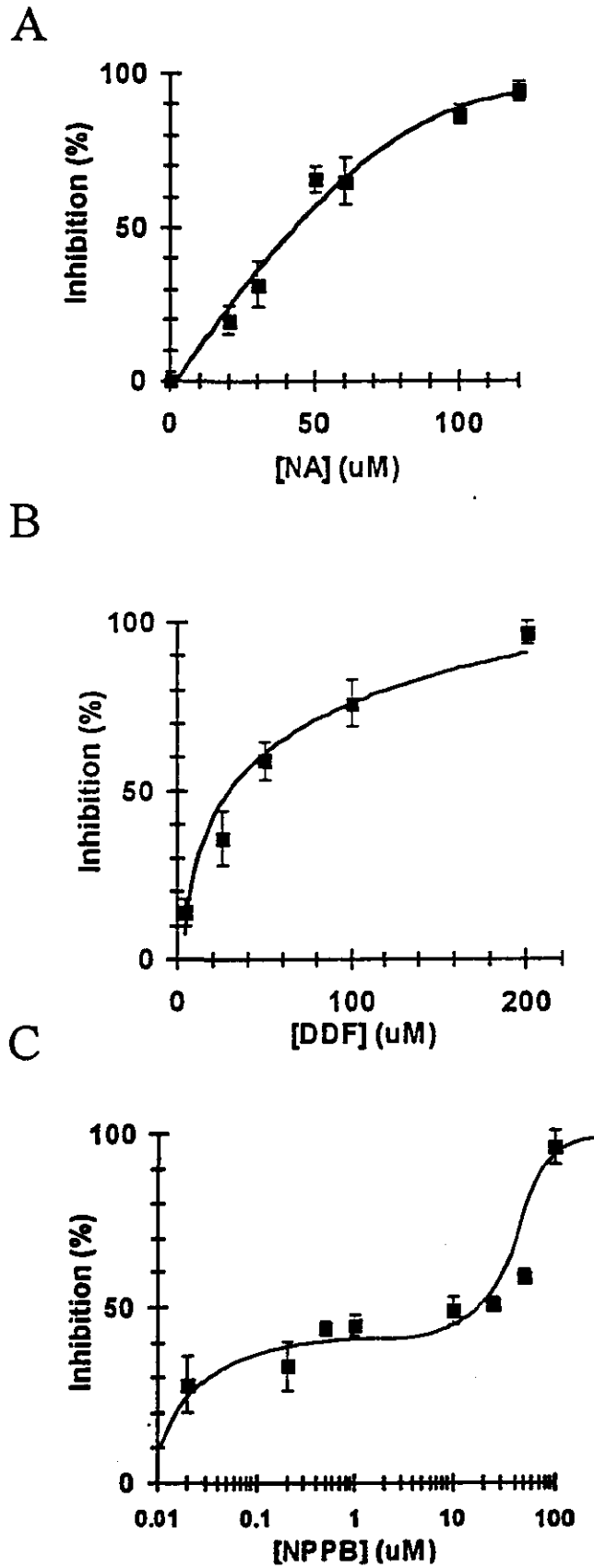


Figure 2.

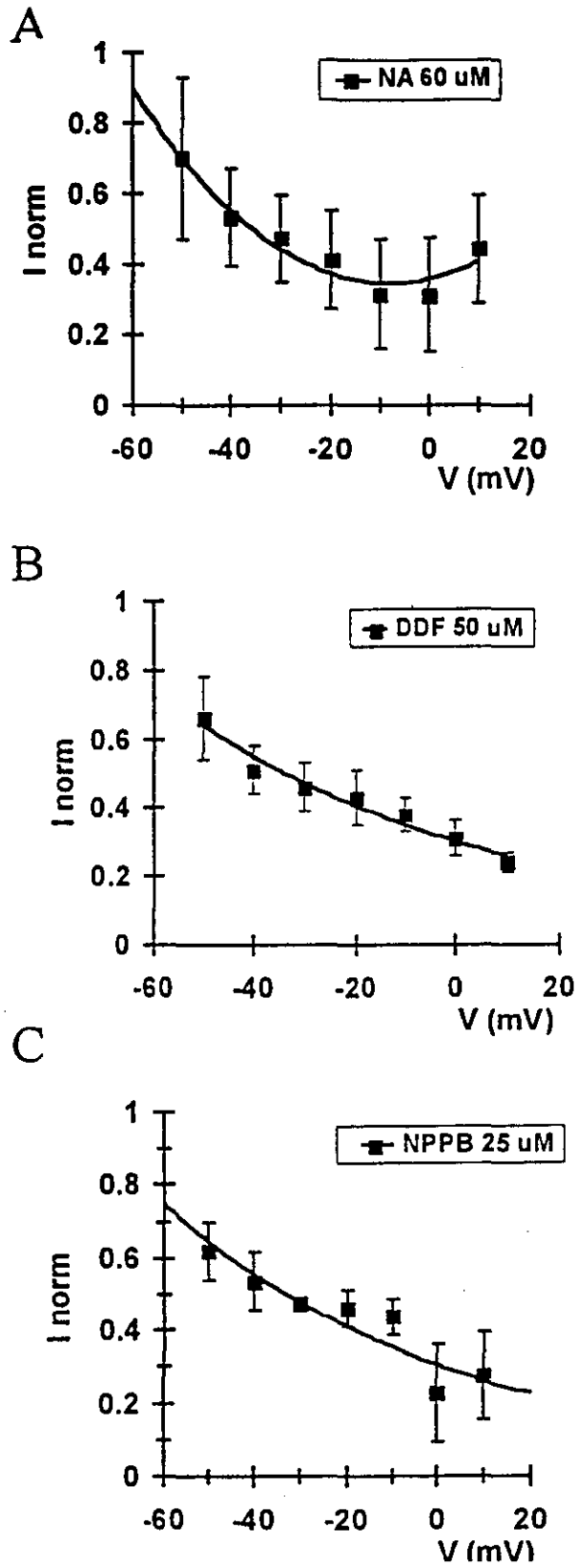
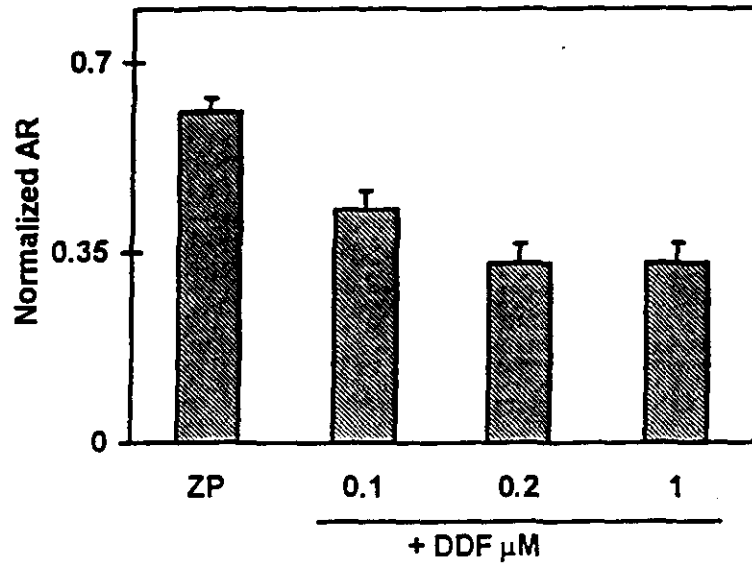


Figure 3.

A



B

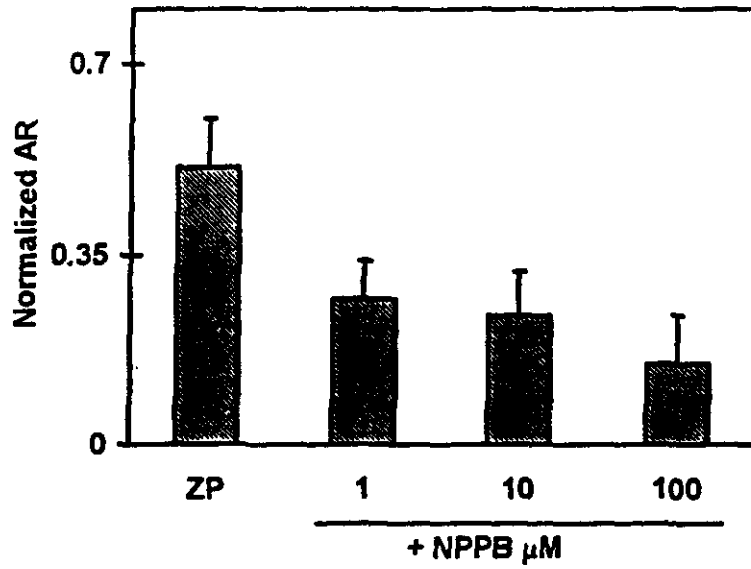


Figure 4.

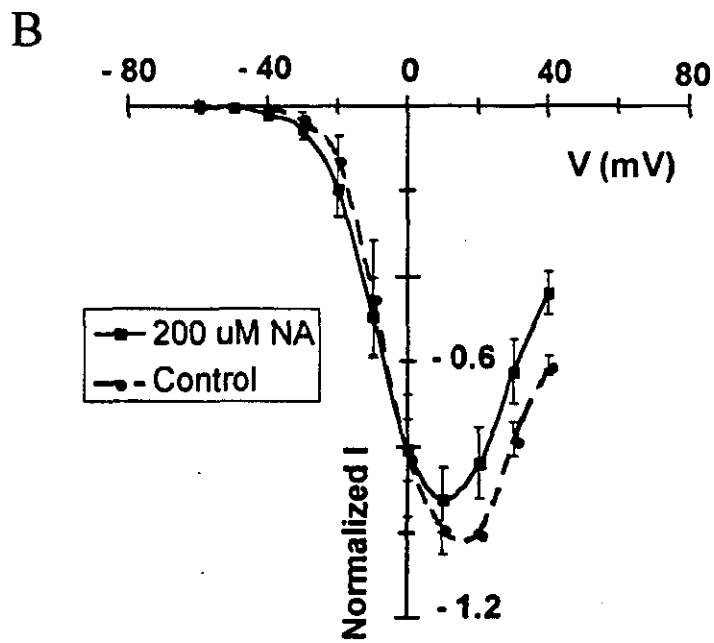
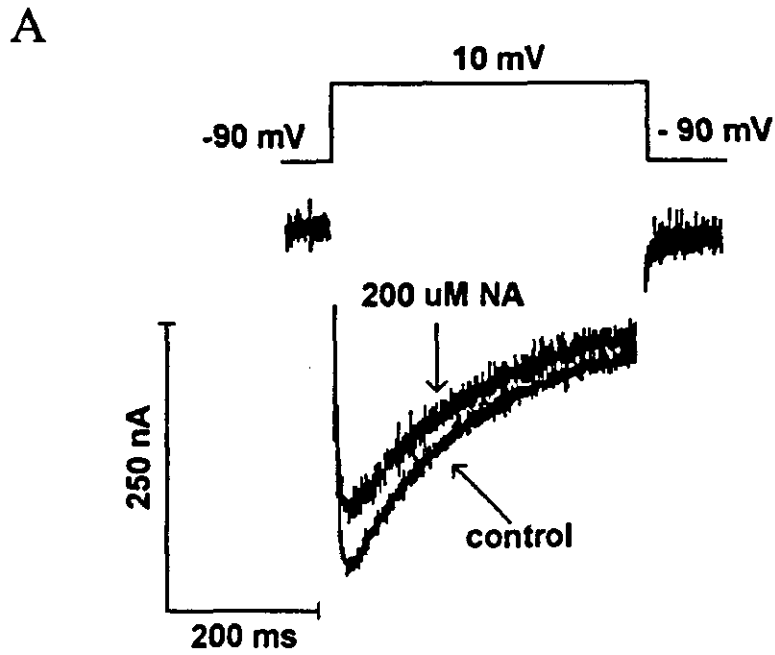


Figure 5.

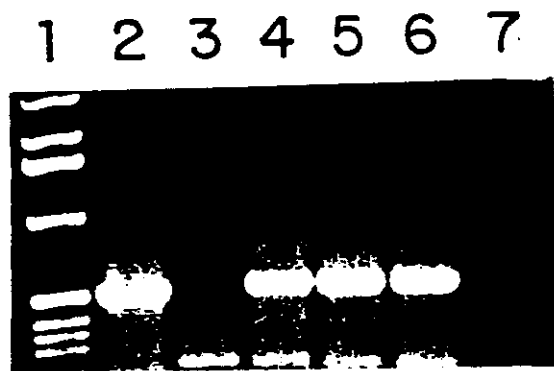


Figure 6.

Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+}

Felipe Espinosa, Alberto Darszon*

Depto. Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. 510–3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received 18 July 1995; revised version received 10 August 1995

Abstract Mouse sperm resting membrane potential (E_r) (-42 ± 8.8 mV), determined with a potential sensitive dye, depended on extracellular K^+ and, in the absence of extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e$), on external Na^+ ($[\text{Na}^+]_e$). Ca^{2+} addition ($> 5 \mu\text{M}$) to sperm in Ca-free media induced a transient hyperpolarization (Ca-ith) which strongly depended on $[\text{Na}^+]_e$ and less on external Cl^- ($[\text{Cl}^-]_e$). Cd^{2+} and Mn^{2+} (μM) mimicked the Ca^{2+} effect, but not Ba^{2+} . The Ca-ith was partially inhibited by ouabain (74%, $IC_{50} = 5.8 \mu\text{M}$) and niflumic acid (38%, $IC_{50} = 240 \mu\text{M}$), indicating the participation of the Na-K ATPase and Cl^- channels. In Ca-free low- Na^+ media, Ca^{2+} addition caused a depolarization sensitive to: nimodipine (25 μM), trifluoperazine (12.5 μM) and Mg^{2+} (1.2 mM), suggesting the participation of Ca^{2+} channels. Since some inhibitors of the sperm Ca-ith block the acrosome reaction (AR), both processes may share transport systems.

Key words: Sperm membrane potential; Ion channel; Na-K ATPase; Acrosome reaction

1. Introduction

Mammalian sperm are exposed to important alterations in their ionic milieu, and their plasma membrane permeability, as they progress in their journey towards the egg. Changes in intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and intracellular pH (pH_i) are fundamental for mammalian sperm motility [1,2], and for the AR induced with the zona pellucida glycoproteins [3] or with progesterone [4,5]. Some of the possible protagonists responsible for these ionic permeability changes are: ion channels for Ca^{2+} [6–8]; K^+ [1,9], Cl^- [10] and one for cations gated by cyclic nucleotides [11]. The sperm Na-K ATPase has also been implicated in capacitation [12] and in the AR [13].

Several of the transport systems mentioned above are voltage-dependent [14]. However, little is known about the ion permeabilities that determine the resting membrane potential (E_r) in mammalian sperm and how it changes during capacitation and the AR [9,15]. Besides the well-known $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i changes that occur during the AR [3,9], there is only one report showing sperm membrane potential changes correlated with ligand-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases [16].

To further understand the ionic basis of the E_r , mouse spermatozoa were exposed to different ionic conditions and membrane potential (E_m) was evaluated using the potential sensitive dye dipropylthiocarbocyanine (Dis- C_3 -(5)) [9,17,18]. We also characterized E_m changes induced by Ca^{2+} additions to spermatozoa suspended in different Ca-free media. The results indicate that cation and anion channels, and the Na-K ATPase participate in the Ca-induced E_m changes. Some of the inhibitors of

these E_m changes also block the AR, suggesting that certain transport systems are involved in both processes.

2. Materials and methods

Valinomycin, ouabain, niflumic acid, methane-sulfonic acid and choline chloride were from Sigma (St Louis, MO). Dis- C_3 -(5) was from Molecular Probes (Eugene, OR). Nimodipine (NDP) and trifluoperazine (TFP) were generously donated by Arturo Hernández.

CD-1 mice older than 3.5 months were sacrificed by cervical dislocation and sperm cells collected from excised epididymides as described [19]. Each mouse yielded $15\text{--}30 \times 10^6$ spermatozoa. The incubation media was a modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer (HMB media) containing 110 mM NaCl, 10 mM NaHCO_3 , 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM HEPES, 20 μM EGTA, 20 mM Na-lactate, 1 mM Na-Pyruvate and 1 mg/ml glucose, pH 7.5–7.6, adjusted with NaOH. Ca^{2+} (1.7 mM) was added or not (Ca-free media) depending on the experiment. The Ca-free media had $\sim\text{nM}$ Ca^{2+} . Sperm were stored at $23 \pm 3^\circ\text{C}$ in HMB media without Ca^{2+} . 20–60- μl aliquots were diluted with the required experimental media to a final volume of 800 μl at 37°C (see below).

Na^+ and/or K^+ were substituted with isoosmotic concentrations of choline⁺ or *N*-methylglucamine. Cl^- was substituted by methane-sulfonic acid (titrated with the hydroxide of the required cation). For experiments in low- Na media (~ 10 mM), except HEPES, other buffers, Mg^{2+} and organic compounds were omitted.

E_m was measured exposing sperm ($2.5 \pm 0.5 \times 10^6/\text{ml}$) to 1 μM Dis- C_3 -(5) in a gently stirred cuvette at 37°C and the fluorescence (620/670 nm excitation/emission wavelength pair) recorded continuously in a Hansatech MkII fluorometer (Norfolk, UK), as described [18]. After reaching a steady fluorescence (1–3 min), E_r and E_m changes were recorded. Thereafter, the K^+ ionophore valinomycin was added and the external K^+ concentration ($[\text{K}^+]_e$) increased stepwise to calibrate the fluorescence changes in mV (Fig. 1A) [18]. K^+ equilibrium potentials were calculated with the Nernst equation [14], considering 120 mM as the $[\text{K}^+]_i$ [20].

To study the reversibility of the Ca^{2+} -induced transient hyperpolarization, sperm were washed in Ca-washing media (CWM; the same as Ca-free media + 2.5 mM EGTA, pH 7.8). When required, spermatozoa were washed by centrifugation 10 min at 20°C and $300 \times g$.

3. Results

3.1. Membrane potential under different ionic conditions

In HMB media + 1.7 mM Ca^{2+} at 37°C , mouse sperm E_r was estimated to be -42 ± 8.8 mV ($n = 16$) (Fig. 1A). The dependence of E_r as a function of the external concentration of Na^+ ($[\text{Na}^+]_e$), K^+ and Cl^- and how Ca^{2+} modulates this potential is shown in Fig. 1B–D. The experiments in Ca-free media were done with (X) or without (solid symbols) preincubating sperm for 20 min at 37°C . The behavior of E_r was basically the same in both conditions, except for 156 mM Na^+ (see below). In the experiments in 1.7 mM Ca^{2+} sperm were not preincubated.

In sperm suspended in Ca-free media, E_r depended on $[\text{Na}^+]_e$. In non-preincubation experiments, when $[\text{Na}^+]_e$ changed from 110 to 156 mM, approximating its value in Ca^{2+} media, E_r hyperpolarized (Fig. 1B). This change in E_r may involve a

*Corresponding author.

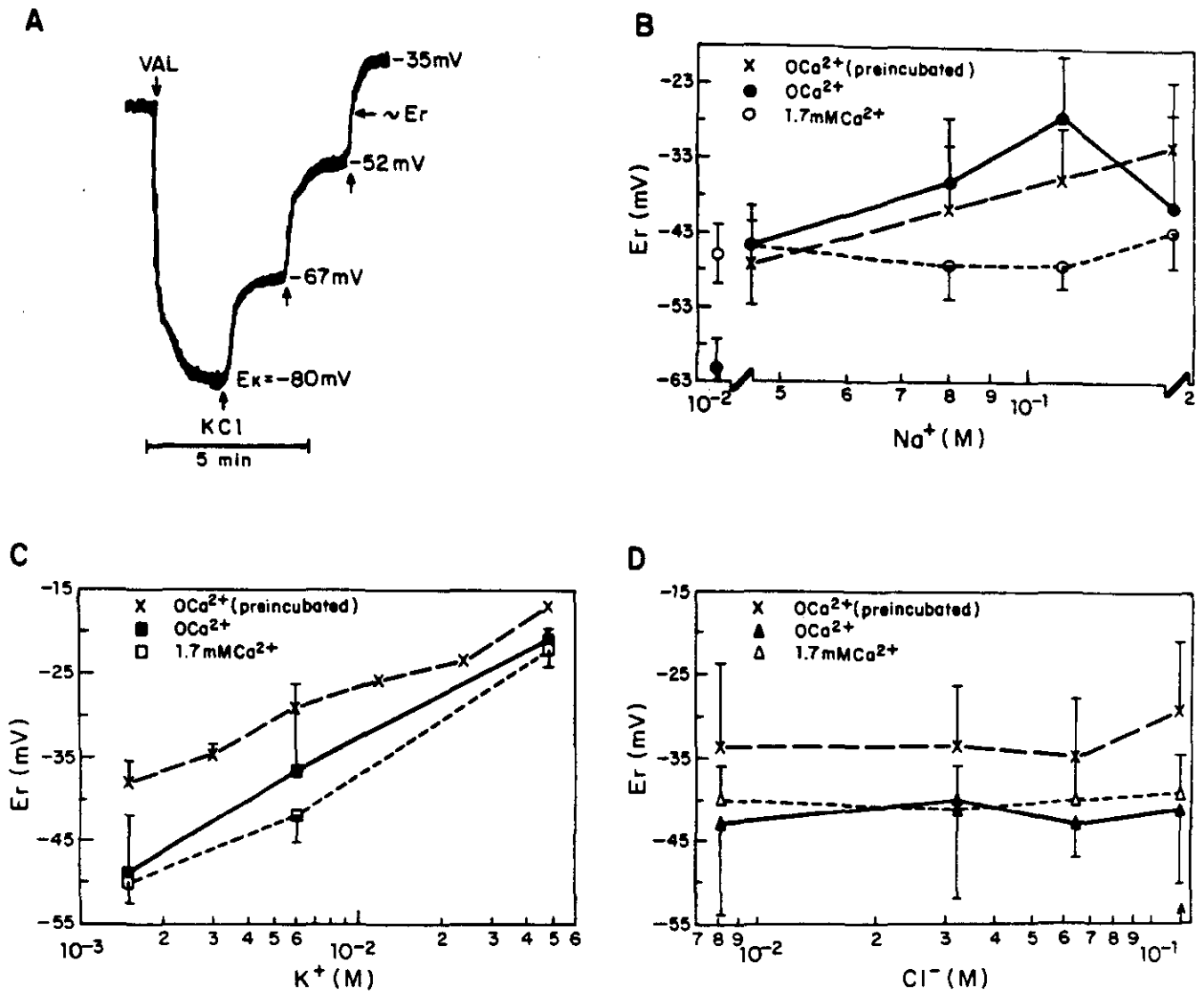


Fig. 1. Influence of external Na^+ , K^+ and Cl^- on resting membrane potential (E_r) of mouse spermatozoa. (A) Sperm suspended in HMB hyperpolarized (downward deflection) after adding 625 nM of valinomycin (VAL). Thereafter, additions of 3.75, 7.5 and 15 mM KCl allowed membrane potential calibration (Nernst potentials on the right, see Section 2), and E_r determination (horizontal arrow). The time scale is in the bottom. The external ionic dependence of the sperm E_r and its modulation by Ca^{2+} is illustrated in parts B for $[Na^+]_e$, C for $[K^+]_e$ and D for $[Cl^-]_e$ in 1.7 mM Ca^{2+} (empty symbols) or in Ca-free media (solid symbols). The crosses correspond to experiments where sperm were preincubated for 20 min at 37°C in that condition. E_r varied according to $[K^+]_e$ in 1.7 mM Ca^{2+} as well as in Ca-free media. However, $[Na^+]_e$ changed E_r only in Ca-free media and $[Cl^-]_e$ seemed not to affect it. Each point is the average of at least four experiments (\pm S.D.). In Fig. D, the arrow on the x axis corresponds to 120 mM Cl^- .

voltage-dependent channel or transport system. It is not seen after a preincubation possibly because some ionic equilibration has occurred. When physiological concentrations of external Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_e$) (1.7 mM) were used, $[Na^+]_e$ no longer affected E_r , which was -45.2 ± 5.4 mV ($n = 33$) in the 10–156-mM range of $[Na^+]_e$.

$[K^+]_e$ influenced E_r both, in presence or absence of external Ca^{2+} (Fig. 1C). Increasing $[K^+]_e$ from 1.5 to 48 mM made E_r ~29 mV more positive. Since in Ca^{2+} -free media $[Na^+]_e$ affected E_r , these experiments were done maintaining $[Na^+]_e$ at 110 mM and having 46 mM choline $^+$, which was then substituted by K^+ as required. Contrary to $[Na^+]_e$ and $[K^+]_e$, substituting $[Cl^-]_e$ for methane-sulfonate did not affect E_r , neither in the presence nor absence of $[Ca^{2+}]_e$ (Fig. 1D).

3.2. Ca-induced transient hyperpolarization (Ca-ith), analogs and inhibitors

Sperm suspended in a Ca-free media (+ 20 μ M EGTA) transiently hyperpolarized upon Ca^{2+} addition (>5 μ M). Fig. 2A,C shows that the amplitude of the hyperpolarization depended on the concentration of Ca^{2+} added. This response was maximal at ~500 μ M $[Ca^{2+}]_e$ and displayed an IC_{50} of 56 μ M. This phenomenon was mimicked by other divalent cations, such as Cd^{2+} and Mn^{2+} , suggesting a common target. Moreover, adding 500 μ M Cd^{2+} or 1.25 mM Mn^{2+} before Ca^{2+} , completely inhibited the Ca-ith (Fig. 2C). Other divalent cations that showed some effect at higher concentrations (mM range) were Zn^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} and the trivalent cation La^{3+} . In contrast, Ba^{2+} induced a small depolarization of 5.2 ± 2.2 mV ($n = 5$) and did

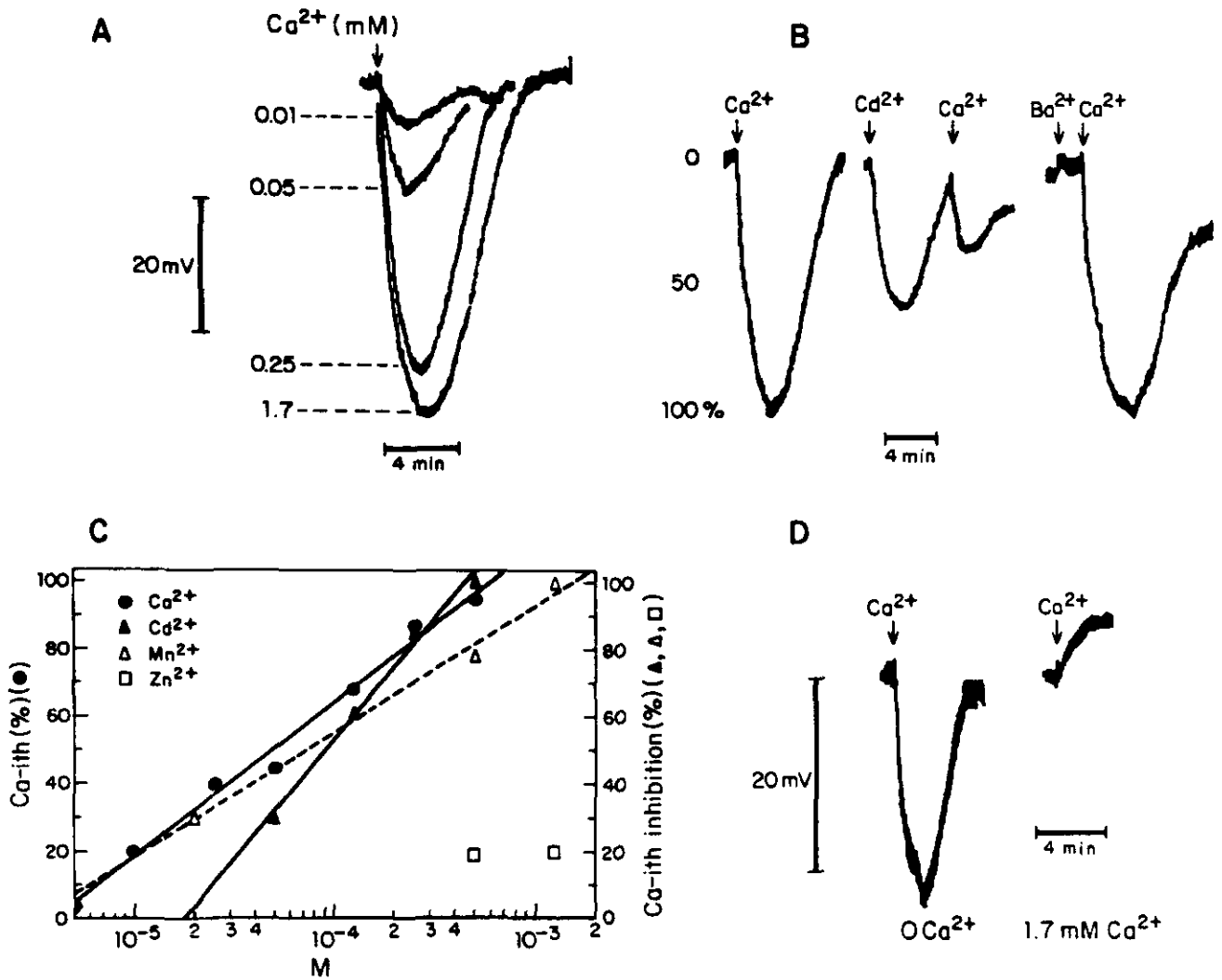


Fig. 2. Ca-ith and analogs. (A) Representative membrane potential responses to Ca^{2+} addition of sperm in Ca-free media upon (≥ 5 independent experiments/concentration). Numbers on the left of the traces indicate the amount of Ca^{2+} (mM) added. (B) Other divalent cations, such as Cd^{2+} (middle trace), induce an analogous hyperpolarization and inhibit the Ca-ith. Ba^{2+} instead induces a small depolarization (5.2 ± 2.2 mV, right trace) and does not inhibit the Ca-ith. Additions in these traces were: 1.7 mM for Ca^{2+} and Ba^{2+} and 0.125 mM for Cd^{2+} . Since these traces were from different sperm populations, the Ca-ith was normalized (% at the right). (C) Dose dependence of the Ca-ith (●, IC_{50} 56 μM) and its inhibition by Cd^{2+} (▲), Mn^{2+} (△) and Zn^{2+} (□) (y axis on the right). Inhibition of the Ca-ith was determined adding 1.7 mM Ca^{2+} after exposure to the indicated concentration of divalent cation. In all cases, S.D. were $< \pm 10\%$ ($n = 4$, except for Mn^{2+} where $n = 3$) and were not included. (D) Ca-ith reversibility. Sperm cells were exposed to 1.7 mM Ca^{2+} for 10 min at room temperature, washed in CWM and the Ca-ith experiment done. Practically 100% of the Ca-ith was recovered (left trace). Sperm in 1.7 mM Ca^{2+} depolarized (right trace) upon a further Ca^{2+} addition. Arrows indicate Ca^{2+} addition (1.7 mM). Time scales are under the traces

not inhibit the Ca-ith (Fig. 2B). Sperm exposed 10 min to 1.7 mM Ca^{2+} in HMB media and washed by centrifugation in CWM, not containing Ca^{2+} , recovered their response (Fig. 2D).

To determine the ionic basis of Ca-ith we measured its amplitude varying $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ by replacing them with choline⁺ and $[\text{Cl}^-]_i$ with methane-sulfonate. The hyperpolarization clearly depended on $[\text{Na}^+]_i$ (Fig. 3A,B). It was maximal at 156 mM and practically disappeared below 46 mM $[\text{Na}^+]_i$, with a ~ 50 mV difference in hyperpolarization between these two Na^+ concentrations. Lowering $[\text{Cl}^-]_i$ from 118 to 11 mM diminished the Ca-ith by ~ 22 mV, $< 50\%$. In contrast, $[\text{K}^+]_i$ did not affect the Ca-ith, even though in these experiments E_r changed from -63 ± 8.7 to -30 ± 3 mV between the lowest and highest $[\text{K}^+]_i$,

respectively (Fig. 1C). These results indicate that sperm suspended in Ca-free media undergo Na^+ and Cl^- permeability changes upon Ca^{2+} addition.

To assess which transport systems participate in the Ca-ith, several inhibitors and blockers were tested (20 mM TEA, 3 μM apamin, 5 μM TTX, amiloride 10–250 μM , > 1.5 μM ouabain and > 20 μM niflumic acid). From those examined, ouabain and niflumic acid had a clear inhibitory effect (Fig. 3C,D). Ouabain inhibited $\sim 70 \pm 10\%$ ($n = 21$) of Ca-ith with an IC_{50} of 5.8 mM and did not require preincubation to have an effect. Even after a 10–20-s incubation with saturating ouabain concentrations, a fraction of the hyperpolarization remained (Fig. 3A, Table 1). Addition of ouabain itself slowly hyperpolarized spermatozoa suspended in Ca-free media. We believe this is not the cause of

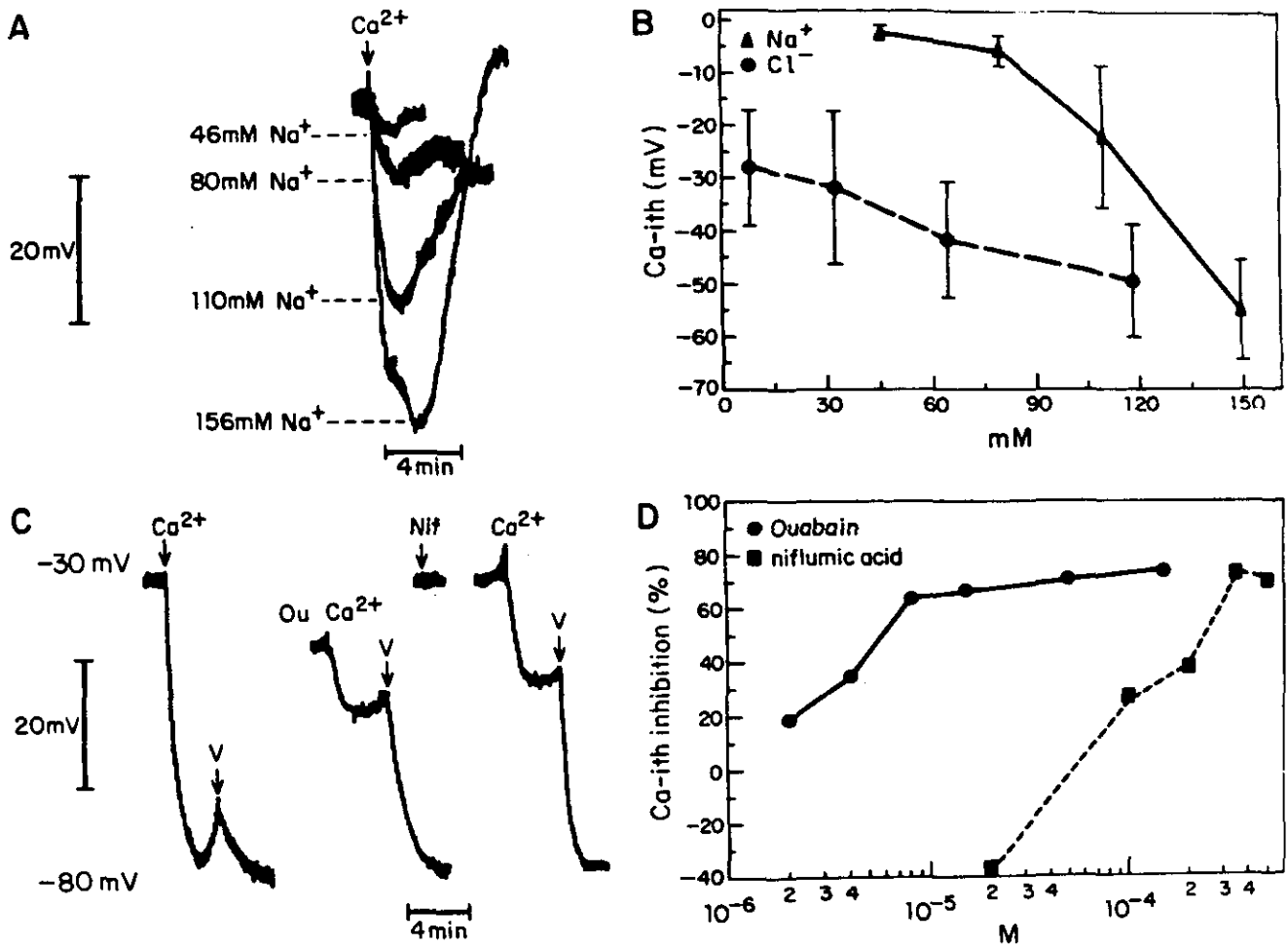


Fig. 3. Ionic dependence and pharmacology of the Ca-ith. (A) Ca-ith at different $[Na^+]_i$ (numbers on the left), Na^+ was substituted with choline⁺. (B) $[Na^+]_i$ and $[Cl^-]_i$ dependence of the Ca-ith ($n = 6$). (C,D) Ca-ith inhibition by ouabain and niflumic acid (Nif). Cells were preincubated 2–6 min in Nif (interruption on the 3rd trace in Fig. 3C), the fluorescence artifact caused by the blocker was corrected. V indicates valinomycin addition for E_r and slope determinations. In Fig. 3D, S.D. were $\pm 10\%$ ($n = 4$). The lower doses of Nif tested ($20 \mu M$) stimulated the Ca-ith causing a 'negative inhibition' (see text for a possible explanation).

the ouabain-induced reduction in the Ca-ith, since in low $[K^+]_i$ experiments, where E_r is more hyperpolarized, Ca-ith amplitude is normal (not shown).

Niflumic acid, a Cl^- channel blocker [21], required a 6-min incubation to fully cause its effect ($\sim 40\%$ inhibition of the Ca-ith), at concentrations commonly used in other cells ($< 200 \mu M$) [22]. Higher concentrations ($> 350 \mu M$) inhibited up to 73% (Fig. 3D, Table 1) however, they themselves hyperpolarized. This indicates that niflumic acid may be acting elsewhere besides the putative Cl^- channel (i.e. K^+ channels activated by fenamates [22]). On the other hand, $20 \mu M$ of this compound potentiated the Ca-ith (37%), as has been observed under certain conditions for GABA-induced Cl^- currents from a rat brain GABA-receptor expressed in *Xenopus* oocytes [23].

3.3. Ca-induced depolarization (Ca-id)

Addition of Ca^{2+} to sperm suspended in a Ca-free low-Na media ($\sim 10 mM$) did not result in a hyperpolarization, but in a sustained depolarization (Ca-id). Mg^{2+} was omitted from the assay in some experiments because, at the concentrations nor-

mally present in Ca-free media ($1.2 mM$), it blocked $> 50\%$ of the depolarization (Fig. 4B). Residual Mg^{2+} contributed by the cell aliquot stored in Ca-free media was $\sim 30 \mu M$. As in the case

Table 1
Effect of ouabain or niflumic acid on E_r and the Ca-ith

Ouabain (μM)	n	E_r (mV)	Ca-ith (mV)	inhibition %
0	9	-43 ± 12	-39 ± 13	0
1.5	8	-39 ± 10	-32 ± 9	20
15	8	-46 ± 5	-13 ± 2	67
150	8	-54 ± 6	-10 ± 4	74
Niflumic Ac. (μM)				
0	15	-35 ± 12	-29 ± 10	0
20	4	-30 ± 10	-40 ± 10	-37
200	12	-34 ± 8	-18 ± 6	38
350	10	-49 ± 6	-8 ± 3	73
500	5	-54 ± 11	-9 ± 2	70

The negative inhibition means that at $20 \mu M$ niflumic acid a potentiation of Ca-ith is seen (for details, see Section 3). All experiments were done in HMB Ca-free media.

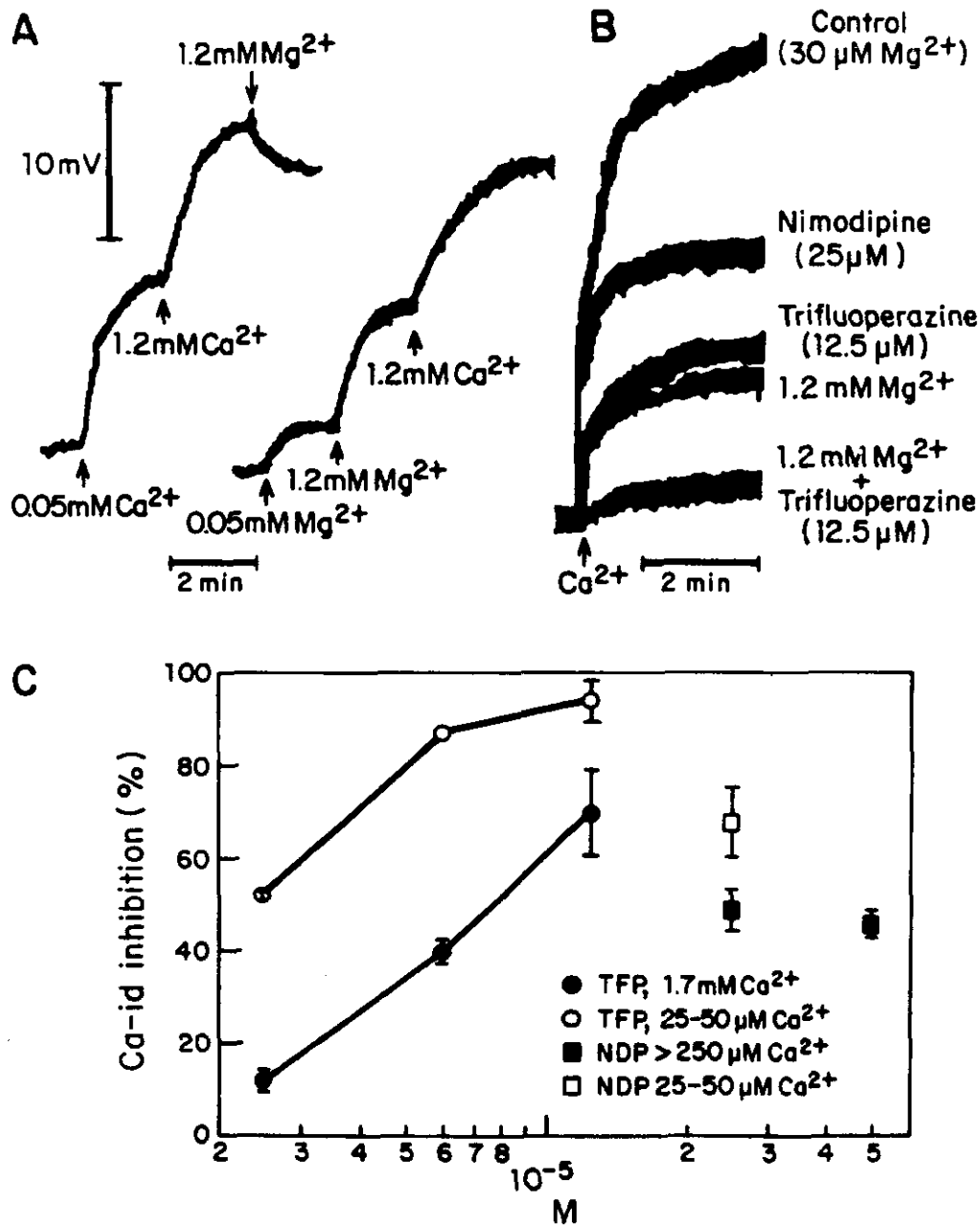


Fig. 4. Ca-id and its blockers. Ca-id experiments were done in low- Na^+ media ($<10 \text{ mM Na}^+$, 140 mM choline^+ , 6 mM K^+ , $30 \mu\text{M Mg}^{2+}$, 0 Ca^{2+} and 150 mM Cl^-). (A) E_m depolarization induced by 0.05 and 1.2 mM Ca^{2+} or Mg^{2+} . Residual Mg^{2+} in these experiments was quelated with $12\text{--}25 \mu\text{M}$ EDTA. Addition of Mg^{2+} blocked the Ca-id (first and third experiments) and by itself induced a smaller depolarization than Ca^{2+} . The Ca-id remained even after adding 1.25 mM Mg^{2+} . (B) TFP ($12.5 \mu\text{M}$), NDP ($25 \mu\text{M}$) and Mg^{2+} (1.2 mM) blocked the Ca-id (1.7 mM Ca^{2+}). Time scales are under the traces. (C) TFP and NDP dose-dependent inhibition of the Ca-id caused by low ($<50 \mu\text{M}$) or high ($>250 \mu\text{M}$) Ca^{2+} concentrations.

of the hyperpolarization in normal Na^+ media, the Ca-id was dependent on the amount of Ca^{2+} added, displaying a similar saturation and IC_{50} (not shown). Fig. 4A illustrates the depolarization induced by Ca^{2+} at 0.05 and 1.2 mM Ca^{2+} (left trace). The magnitude of maximal depolarization was $21.4 \pm 3.2 \text{ mV}$ ($n = 6$) and half-maximal depolarization was reached at $\sim 50 \mu\text{M Ca}^{2+}$. The trace on the right of Fig. 4A shows how Mg^{2+} inhibited the depolarization. In $0\text{Ca}\text{--}0\text{Mg}$ media, Mg^{2+} itself depolarized but with lower potency than Ca^{2+} (right trace). Thus, Fig. 4A suggests that both divalent ions permeate through the same

channel, Ca^{2+} passes more efficiently and Mg^{2+} blocks. This is consistent with the properties of other Ca^{2+} channels [14,25].

The Ca-id was blocked with TFP and NDP (Fig. 4B,C). TFP ($12.5 \mu\text{M}$) blocked $70 \pm 9.2\%$ ($n = 6$) of Ca-id when 1.7 mM Ca^{2+} was added and $94 \pm 4.5\%$ ($n = 5$) with 0.05 mM Ca^{2+} additions. NDP ($>25 \mu\text{M}$) blocked the Ca-id $48 \pm 3.8\%$ ($n = 7$) for Ca^{2+} additions $>0.25 \text{ mM}$ and $68 \pm 7.5\%$ ($n = 4$) for 0.05 mM Ca^{2+} additions. This indicates that Ca^{2+} may be permeating through an L-type Ca^{2+} channel (see Section 4). Other blockers tested showed no apparent effect at concentrations higher than

those reported to block their respective channels (2.5 μM ω -conotoxin for Ca^{2+} channels; 70 nM $\text{TiTx}\gamma$ toxin and 6 μM TTX for Na^+ channels; 10 mM TEA⁺, 50 nM β -dendrotoxin and 20 μM charybdotoxin for K^+ channels).

4. Discussion

The resting membrane potential of mouse spermatozoa in HMB media, estimated with a membrane potential sensitive cyanine dye, was -42 ± 8.8 mV. This value is close to the one determined in bull spermatozoa under similar conditions [9]. This potential was sensitive to extracellular K^+ and not to Cl^- . In Ca-free media ($\sim\text{nM}$ $[\text{Ca}^{2+}]_e$), ion substitution experiments indicated that mouse sperm have a substantial permeability to Na^+ . E_r hyperpolarized in this media as $[\text{Na}^+]_e$ was lowered from 110 to 10 mM (Fig. 1B), but not in the presence of normal Ca^{2+} concentrations.

Addition of Ca^{2+} ($>5 \mu\text{M}$) to sperm in Ca-free media induced a transient hyperpolarization. This Ca-ith strongly depended on $[\text{Na}^+]_e$. When $[\text{Na}^+]_e$ was replaced by a non-permeant monovalent cation, the Ca-ith decreased and completely disappeared at around 40 mM $[\text{Na}^+]_e$. These results suggest that in the absence of Ca^{2+} , Na^+ can permeate through Ca^{2+} channels, as is the case in other systems [14,25]. On the other hand, ouabain, a specific inhibitor of the Na-K ATPase, inhibited 70% of the Ca-ith, indicating the participation of this pump in the response. In red blood cells, squid axon [26] and in skeletal myoballs [27], the Na-K ATPase contribution to the resting membrane potential were calculated to be -0.3 , 5 and -5.7 mV, respectively. However, under non-stationary conditions, the contribution of this pump to E_m could be much larger [28]. Ouabain (mM) has been shown to inhibit the AR in mouse spermatozoa [13]. Amiloride (10–250 μM), a poorly specific Na-Ca exchanger inhibitor [29], failed to affect Ca-ith hinting it does not contribute to this response.

Replacing $[\text{Cl}^-]_e$ for a non-permeant anion decreased the Ca-ith; and niflumic acid, a blocker of some Cl^- channels, significantly inhibited this response. This result suggests the participation of a Ca^{2+} -modulated Cl^- channel, which would open as Ca^{2+} enters the cell [21]. However, $>50\%$ of the Ca-ith remains in low $[\text{Cl}^-]_e$, arguing that other ion permeabilities are involved in this response. In the human sperm AR, a progesterone potentiated GABA-Cl channel has been implicated in the AR induced by this hormone; in mouse sperm GABA and progesterone can act synergistically to induce the AR [30]. Interestingly, the rat brain GABA receptor expressed in *Xenopus* oocytes is blocked (60%) by niflumic acid [23]. Although there is no evidence that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may modulate the sperm GABA receptor as for other systems [31], it is worth considering its possible participation in the Ca-ith.

Ca^{2+} influx is essential for the sperm AR, a crucial event in fertilization in mammals and in many other species [2,15]. Dihydropyridines, Co^{2+} and Ni^{2+} , known blockers of voltage-dependent Ca^{2+} channels, inhibit the AR of ram, bull and mouse sperm, suggesting their participation in this reaction [9]. Ca^{2+} additions in low Na^+ media resulted in a sperm depolarization (Fig. 4). This Ca-id was sensitive to relatively high NDP concentrations (25 μM) that block L-type [32] or even T-type Ca^{2+} channels [33], consistent with the presence of voltage-dependent Ca^{2+} channels in mammalian sperm [9]. T-type Ca^{2+} channels have been described in spermatogenic cells [34].

TFP (12.5 μM), which can block Ca^{2+} channels directly [35] and inhibits the AR in sea urchin sperm [36, 37], also inhibited the Ca-id. This compound, a known calmodulin inhibitor [38], may be blocking the Ca-id in mouse sperm acting directly on Ca^{2+} channels and/or via calmodulin. On the other hand, toxins that block Na^+ channels (TTX and $\text{TiTx}\gamma$) or K^+ channels (TEA⁺, apamin, charybdotoxin and β -dendrotoxin) did not inhibit neither the Ca-ith nor the Ca-id.

Taken altogether, these observations can be considered in the following working scheme to explain the Ca-ith. Na^+ can permeate through Ca^{2+} channels in the absence of external Ca^{2+} increasing $[\text{Na}^+]_i$, and stimulating the Na-K ATPase [26]. Addition of Ca^{2+} blocks Na^+ influx through the channel and increases the influence of the Na-K ATPase on E_m , both effects would hyperpolarize sperm. As Ca^{2+} enters the cell through the channel (and/or other membrane transporters), it activates a Ca^{2+} -modulated Cl^- channel, which accounts for part of the Ca-ith explaining its sensitivity to niflumic acid. Mn^{2+} and Cd^{2+} and at higher concentrations Ni^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} , mimic the Ca-ith, they can apparently block Na^+ uptake through the channel and compete for the Ca^{2+} -binding site(s), since they inhibit the response induced by a subsequent addition of Ca^{2+} . In contrast, Ba^{2+} which permeates well through Ca^{2+} channels and has less affinity for channel Ca^{2+} -binding sites [39], at mM concentrations did not induce a hyperpolarization but a depolarization. Since certain inhibitors used here to block the Ca-ith and the Ca-id also block the AR, some of the transport systems involved in these mouse sperm responses to Ca^{2+} may participate in the AR.

Acknowledgments: This work was supported by grants from CONA-CyT, DGAPA and an International Research Scholar Award to A. Darszon from the Howard Hughes Medical Institute. We thank C. Beltrán, C. Treviño and A. Liévano for reading the manuscript.

References

- [1] Babcock, D.F., Rufo, G.A. and Lardy, H.A. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1327–1331.
- [2] Ward, C.R. and Kopf, G. (1993) Dev. Biol. 158, 9–34.
- [3] Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L. and Babcock, D.F. (1989) Dev. Biol. 135, 133–146.
- [4] Thomas, P. and Meizel, S. (1989) Biochem. J. 264, 539–546.
- [5] Blackmore, P.F., Neulen, J., Lattanzio, F. and Beebe, S. J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 18655–18659.
- [6] Cox, T. and Peterson, R.N. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 162–168.
- [7] Cox, T., Campbell, P. and Peterson, R.N. (1991) Mol. Reprod. Dev. 30, 135–147.
- [8] Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P. and Liévano, A. (1994) FEBS Lett. 338, 232–6.
- [9] Florman, H.M., Corron, M.E., Kim, T.D. and Babcock, D.F. (1992) Dev. Biol. 152, 304–314.
- [10] Wistrom, A.C. and Meizel, S. (1993) Dev. Biol. 159, 679–690.
- [11] Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. and Kaupp, B. (1994) Nature (London) 368, 859–863.
- [12] Fraser, L.R., Umar, G. and Sayed, S. (1993) J. Reprod. Fert. 97, 539–549.
- [13] Mrsny, R.J. and Meizel, S. (1981) J. Cell Biol. 91, 77–82.
- [14] Hille, B. (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [15] Darszon, A., Liévano, A. and Beltrán, C. (1995) Curr. Top. Dev. Biol. in press.
- [16] Foresta, C., Rossato, M. and Di Virgilio, F. (1993) Biochem. J. 294, 279–283.

- [17] González-Martínez, M. and Darszon, A. (1987) FEBS Lett. 218, 247–250.
- [18] Reynaud, E., De la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. and Darszon, A. (1993) FEBS Lett. 329, 210–214.
- [19] Lee, M.A. and Storey, B.T. (1985) Biol. Reprod. 33, 235–246.
- [20] Babcock, D.F. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6380–6389.
- [21] Sanchez-Vives, M.V. and Gallego, R. (1994) J. Physiol. (London) 475, 391–400.
- [22] Ottolia, M. and Toro, L. (1994) Biophys. J. 67, 2272–2279.
- [23] Woodward, R.M., Polenzani, L. and Miledi, R. (1994) J. Pharmacol. Exp. Ther. 268, 806–817.
- [24] Liévano, A., Vega Saenz de Miera, E.C. and Darszon, A. (1990) J. Gen. Physiol. 95, 273–296.
- [25] Fukushima Y. and Hagiwara, S. (1985) J. Physiol. 358, 255–284.
- [26] Stein, W. (1990) Channels, Carriers and Pumps. An Introduction to Membrane Transport. Academic Press, New York, NY.
- [27] Li, K.X. and Sperelakis, N. (1994) J. Cell Physiol. 159, 181–186.
- [28] Holgrem, M. and Rakowski, R.F. (1994) Biophys. J. 66, 912–922.
- [29] DiPolo, R. and Beaugue, L. (1994) Am. J. Physiol. 266, C1382–C1391.
- [30] Roldan, E.R.S., Murase, T. and Shi, Q. (1994) Science 263, 1578–1581.
- [31] Macdonald, R.L. and Olsen, R.W. (1994) Annu. Rev. Neurosci. 17, 569–602.
- [32] Pollo, A., Lovallo, M., Biancardi, E., Shev, E., Socci, C. and Carbone, E. (1994) Pflugers Arch. 423, 462–471.
- [33] Liévano, A., Bolden, A. and Horn, R. (1994) Am. J. Physiol. 267, C411–C424.
- [34] Hagiwara, S. and Kazuyoshi, K. (1984) J. Physiol. 356, 135–149.
- [35] Nakazawa, K., Higo, K., Abe, K., Takima, Y., Saito, K. and Matsuki, N. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 137–141.
- [36] Garbers, D.L. and Kopf, G.S. (1980) Adv. Cycl. Nuc. Res. 13, 251–306.
- [37] Guerrero, A. and Darszon, A. (1989) Biochim. Biophys. Acta 980, 109–116.
- [38] Cheung, W.I. (1988) Ann. NY Acad. Sci. 522, 74–87.
- [39] Hess, P. and Tsien, R.W. (1984) Nature (London) 309, 453–456.