



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Relación entre Glucólisis y Voltaje Transmembranal  
en el Espermatozoide Humano  
Contribución de la ATPasa  $Na^+ / K^+$ .

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA:

Mirta Araceli Bonilla Hernández

Director de Tesis:

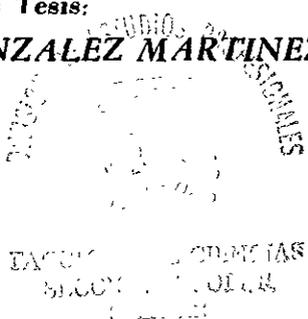
DR. MARCO TULIO GONZALEZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.

2000

277840





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

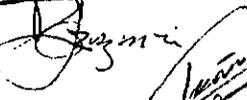
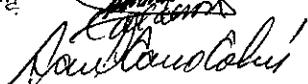
**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Relación entre Glucólisis y Voltaje Transmembranal  
en el Espermatozoide Humano. Contribución de la  
ATPasa  $Na^+/K^+$ .  
realizado por  
Mirta Araceli Bonilla Hernández  
con número de cuenta 9455536-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Marco González Martínez	
Propietario	M. G. Martín Guzmán Grenfell	
Propietario	Biol. Iván Ramiro Espínola Alvarado	
Suplente	Dr. María Elena Calderón Segura	
Suplente	M. C. Saul Cano Colín	

Edna María Suárez Díaz  
*Edna M. Suárez D.*

Consejo Departamental de Biología

Tesis realizada en el departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la dirección del Dr. Marco T. González Martínez

## INDICE.

RESÚMEN.. . . . .	1
I. INTRODUCCIÓN.....	4
I 1. Características generales de los gametos sexuales. . . . .	5
I.2. Interacción ovocito-espermatozoide durante la fecundación . . . . .	9
I 3. Metabolismo energético en las células.....	12
II. ANTECEDENTES. . . . .	14
III. OBJETIVOS. ....	17
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
IV 1 Reactivos. . . . .	18
IV.2 Obtención y purificación de espermatozoides.....	18
IV.3 <i>Detección simultánea del potencial de membrana y concentración de calcio intracelular</i> . . . . .	20
IV.4 Calibración del potencial de membrana.....	21
IV.5. Calibración de la concentración de calcio intracelular. . . . .	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.. . . . .	24
VI. CONCLUSIONES . . . . .	49
VII. LITERATURA CITADA.....	51

## RESÚMEN.

El presente trabajo de investigación describe algunos de los mecanismos de transporte iónico resultado de la fuente y utilización de energía metabólica, la cual, mantienen y regulan los valores del potencial de membrana en el espermatozoide humano. Se investigó el efecto de la glucosa sobre el potencial de membrana en espermatozoides humanos mantenidos en un medio sin este carbohidrato. Este medio carente de carbohidratos no representa una condición fisiológica. Cuando se adicionó 2 mM de glucosa a la celda de registro se presentó una hiperpolarización transitoria que se reprodujo de igual manera con la adición de otros azúcares metabolizables, (fructuosa), pero no con la 2-desoxi-glucosa el cual no es metabolizable. La adición de 10 mM de fluoruro de sodio (NaF) un inhibidor de la enzima enolasa bloqueó por completo el efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa. Este comportamiento indicó que la hiperpolarización depende del metabolismo de la glucosa (glucólisis).

El colorante utilizado para detectar los cambios en el potencial eléctrico de la membrana fue el diSC<sub>3</sub>(5). Este colorante tiene carga positiva y se mueve transporta hacia el interior de la célula y a otros organelos como la mitocondria. Esto nos condujo a evaluar la posible contribución del potencial de la membrana mitocondrial en la hiperpolarización inducida por la glucosa. Los inhibidores de la cadena respiratoria (rotenona, antimicina A y cianuro) no modificaron el efecto

hiperpolarizante inducido por la adición de glucosa u otros azúcares. Por lo tanto, el potencial de membrana detectado con el colorante corresponde a una contribución principal de la distribución transmembranal. Sin embargo, el desacoplante mitocondrial CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona), que colapsa el gradiente de protones, inesperadamente inhibió la hiperpolarización inducida por la glucosa. En experimentos en los que se midió de manera simultánea la concentración calcio intracelular y el potencial de membrana, se observó que el CCCP alteró el potencial transmembranal y lo pudo llevar al potencial electroquímico para la distribución de protones ( $E_H$ ). En efecto, en espermatozoides hiperpolarizados con glucosa, el CCCP indujo una depolarización corroborada cuando se indujo un aumento en la concentración de calcio interno sensible a níquel, indicando la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Asimismo, en un medio sin calcio, que es una condición conocida que depolariza la membrana del espermatozoide, el CCCP indujo una hiperpolarización sin cambios en el calcio interno. Esto sugirió que el CCCP puede mantener el potencial de membrana cerca del  $E_H$  con una fuerza suficiente para evitar la hiperpolarización inducida por la glucosa.

Con el objeto de identificar la permeabilidad iónica que causa la hiperpolarización inducida por la glucosa, se incubaron espermatozoides en un medio con alta concentración extracelular de  $K^+$  y se utilizó un bloqueador

específico de los canales de  $K^+$ , el tetraetilamonio (TEA). En ambas condiciones la hiperpolarización no se alteró. Tampoco se encontró ninguna participación de canales de  $Cl^-$ , debido a que la adición de ácido niflúmico, un bloqueador de los canales de cloruro, no afectó la hiperpolarización. Por lo tanto, la activación de los canales de  $K^+$  y  $Cl^-$  no participan en la hiperpolarización inducida por la glucosa. En presencia de *ouabaina*, un bloqueador específico de la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , el efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa se inhibió completamente. Esto sugirió que la activación de la bomba, fue la causa de la hiperpolarización en virtud de que es electrogénica, ya que, intercambia  $3Na^+$  por  $2K^+$ . Esta hipótesis se comprobó por el hecho de que en un medio sin potasio, que no permite la actividad de la bomba, no se presentó una hiperpolarización inducida por la glucosa. Cuando 1 mM de  $K^+$  se añadió a la celda de registro se observó la hiperpolarización sensible a *ouabaina*.

Nuestros resultados evidencian claramente la participación de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  en el efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa. De este modo, la degradación de la glucosa y la síntesis de ATP provoca la activación de esta bomba y el restablecimiento de las concentraciones de los iones de  $Na^+$  y  $K^+$  resultando en una hiperpolarización transitoria.

## I. INTRODUCCION.

La fecundación en los mamíferos es un proceso altamente conservado durante la evolución. La importancia de la reproducción interna radica fundamentalmente en la gran probabilidad del crecimiento del cigoto evitando la competencia intraespecífica o interespecífica que existe en aquellos organismos con reproducción externa. De igual forma asegura el alimento y la protección indispensables para que el cigoto pueda llegar al final de su desarrollo.

Para que se lleve a cabo este proceso en los gametos, existen receptores específicos que permiten el reconocimiento entre las especies evitando una posible fecundación inviable entre especies distantes. Es importante de recalcar que previo a y durante la fecundación se presenta un gasto energético considerable que asegura la supervivencia de la especie y garantiza su descendencia. Posiblemente el proceso de fecundación en los mamíferos sea el *más complejo en el reino animal como lo constatan diversos proyectos experimentales* que han permitido explicar algunos pasos, el orden, la cascada de variables y condiciones necesarias para que se realice exitosamente.

## **I. 1 Características generales de los gametos sexuales.**

El espermatozoide humano es una célula compacta con una proporción mínima de citoplasma el cual va perdiéndose durante la espermatogénesis y su maduración en el epidídimo y esta altamente especializada para cumplir su función primordial, la de fecundar al ovocito. Su tamaño es tan reducido, que limita su estudio mediante análisis electrofisiológicos. No contiene aparato de síntesis de proteínas (RNAm, RNAt y ribosomas), presenta su ADN condensado en el núcleo localizado por debajo de la vesícula acrosomal (derivada del aparato de Golgi) la cual contiene enzimas líticas (figura 1). Su estructura se divide en la cabeza, la pieza media y el flagelo. La cabeza es una estructura con un tamaño aproximado de 10 micras que incluye el material nuclear que ocupa la mayor volúmen, y la vesícula acrosomal. La pieza media se sitúa entre la cabeza y el flagelo y es donde se localizan las mitocondrias, que llevan a cabo las reacciones metabólicas que aportan la energía necesaria para la locomoción. El flagelo está constituido por el axonema, estructura encargada de la locomoción.

El contenido citoplasmático del ovocito está compuesto principalmente de proteínas, lípidos, ribosomas, ARNt (transferencia) y ARNm (mensajero). En la periferia del citoplasma se encuentran los gránulos corticales (contenedores de enzimas líticas principalmente mucopolisacáridos y proteínas hialinas) que son

organelos especializados derivados del aparato de Golgi (Gilbert, S. F., 1992). La zona pelúcida es una matriz extracelular constituida por 3 glicoproteínas, la ZP<sub>1</sub>, ZP<sub>2</sub> y ZP<sub>3</sub> que rodean al óvulo de los mamíferos. Es secretada durante la ovogénesis y persiste durante la preimplantación del óvulo ya fecundado. La zona pelúcida es el sitio en el cual ocurre el reconocimiento entre el ovocito y el espermatozoide durante la fecundación (figura 2). Este reconocimiento activa la *reacción acrosomal (RA) en el espermatozoide que permite la fusión entre el ovocito y el espermatozoide*. Posterior a la fecundación, la zona pelúcida juega un papel importante previniendo la polispermia y brindando protección física al embrión a lo largo de su trayecto hasta la cavidad uterina. El reconocimiento ovocito-espermatozoide es específico debido a una interacción dada por receptores en la superficie del espermatozoide y la principal glicoproteína de la zona pelúcida: la ZP<sub>3</sub>. La especificidad de la ZP<sub>3</sub> se debe a las cadenas de O-oligosacaridos que posee (Bleid, et al, 1990).

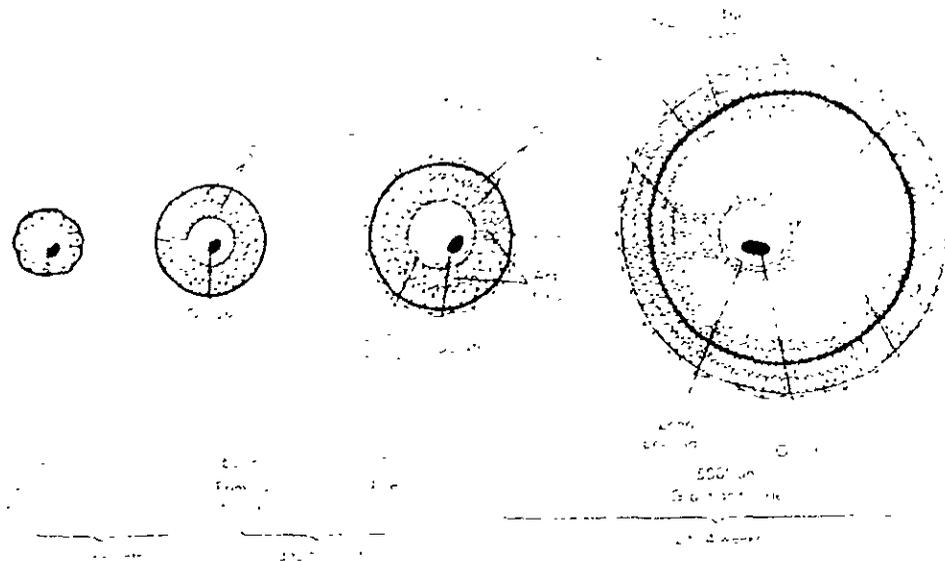


Figura 2. Estructura morfológica del ovocito humano.

## **I. 2 Interacción ovocito-espermatozoide.**

La función primordial del espermatozoide es la de fecundar al ovocito. Para ello, los espermatozoides de mamífero entran en un proceso denominado capacitación, el cual se da en el tracto genital femenino. La capacitación dura en el humano de 4 a 6 horas, aproximadamente y se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que habilitan al espermatozoide a fecundar al ovocito. Algunos de estos cambios fisiológicos del espermatozoide observados durante la capacitación son el incremento en la concentración del calcio intracelular y del pH intracelular, la fosforilación de proteínas cinasas y un aumento evidente en la motilidad ó hiperactividad (alta frecuencia del movimiento con direccionalidad lineal) (Mujica A., et al., 1991). Una característica funcional de la capacitación es que el espermatozoide capacitado se encuentra preparado para la reacción acrosomal, que puede ser inducida por elementos presentes en el tracto genital femenino, la glicoproteína ZP<sub>3</sub> y la progesterona que esta contenida en le fluido folicular del óvulo (Suárez, S. et al., 1986).

Para que la interacción óvulo-espermatozoide capacitado se lleve a cabo, los receptores de la membrana del espermatozoide deben de ser reconocidos por la ZP<sub>3</sub> (Sneil, W. J. y McWhite, J., 1996 y Brewis I. y Moore D. M., 1997). Las proteínas del espermatozoide propuestas para llevar a cabo tal interacción son, la  $\beta$ -1,4-galactociltransferasa (GalTasa) (Miller, et. al., 1992, Gong, et al,

1995), la proteína 56 Dka (Bleid y Wassarman, 1990) y una proteína con una tirosina fosforilada, la  $\beta$  95 (Leyton y Sailing, 1989). Como consecuencia de esta interacción se desencadena la RA en el espermatozoide (figura 2A). La RA es un evento de exocitosis en el cual la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal induciendo la liberación de enzimas líticas (contenidas en la vesícula acrosomal). Además se expone una zona ecuatorial en la membrana del espermatozoide la cual finalmente se fusiona con el ovocito.

En ratones los espermatozoides que presentarán la RA permanecen unidos a la zona pelúcida por ligandos localizados en otra glicoproteína: la ZP<sub>2</sub> (Bleid, Greve & Wassarman, 1988).

La fusión del espermatozoide con el óvulo causa un incremento en la concentración interna de calcio (Florman, et al, 1992) y del pH que inducen la exocitosis de los gránulos corticales situados en el óvulo, liberando su contenido (proteasas y glicosidasas) hacia la zona pelúcida. Estas enzimas causan un endurecimiento de la zona pelúcida por un cambio en la conformación de las cadenas de O-oligosacáridos y consecuentemente, una pérdida en la actividad de los receptores de la zona evitando que más espermatozoides se unan. Este proceso constituye un mecanismo de bloqueo de la polispermia (Wassarman, 1991).

## I. Metabolismo energético en el espermatozoide.

El metabolismo involucra a una serie de procesos bioquímicos que le permiten a las células utilizar la energía contenida en las biomoléculas para propósitos tan diversos como: a) realización de trabajo mecánico (como la contracción y la movilidad flagelar), b) transporte activo de iones y moléculas y, c) la síntesis de otras biomoléculas a partir de precursores sencillos. Esta energía libre se obtiene fundamentalmente de la oxidación de macromoléculas combustibles exógenas, como la glucosa, o endógenas, principalmente los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos.

El intercambiador de la energía libre por excelencia es el ATP (adenosin trifosfato). La forma activa del ATP se halla en un complejo formado con  $Mg_2^+$  o  $Mn_2^+$ . La energía libre es liberada durante la hidrólisis de su enlace fosfodiéster. Los nucleótidos de piridina y flavina en su forma reducida transfieren electrones a una cadena de transporte electrónico (cadena respiratoria). Este flujo de electrones forma el ATP a partir de ADP y  $P_i$  mediante un proceso mitocondrial conocido como fosforilación oxidativa. El contenido normal de glucosa en el semen humano esta alrededor de  $0.41 \pm 0.09$  mmol/l (Povoa, et al., 1986). En medios con glucosa, suplementados con piruvato y lactato, los espermatozoides presentan la hiperactividad característica adquirida (e indispensable) durante la capacitación.

De hecho la glucosa exógena es un requerimiento indispensable para la capacitación en ratón y hamster (Mujica, A., et al, 1991)

## II. ANTECEDENTES.

Recientemente se ha estado investigando en nuestro laboratorio la función que tienen los canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV) en el aumento en la concentración del calcio que induce la progesterona en el espermatozoide humano. Para que estos canales se activen se requiere de un pulso despolarizante que parta de un potencial de membrana negativo, usualmente más negativo que  $-65$  mV (Hille B., 1992). A este voltaje, los CCDV están en una conformación cerrada y son susceptibles de abrirse como resultado de una despolarización.

En espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes, se ha medido un potencial de reposo de  $-40$  mV. A este potencial, los CCDV están en un estado parcialmente inactivado y por lo tanto no pueden utilizarse plenamente para medir calcio como respuesta a un pulso despolarizante. Se investigó si durante el proceso de capacitación (el estado en el cual el espermatozoide responde a la progesterona de manera óptima), el espermatozoide se hiperpolarizaba de manera que pudiera eliminarse la inactivación de los CCDV. El potencial de membrana se detectó con el colorante fluorescente  $\text{diSC}_3(5)$  en medio amortiguado con HEPES. Se encontró que la incubación por 4 horas en condiciones capacitantes (medio HSM amortiguado con fosfato-bicarbonato bajo atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  y 95 % de aire), los espermatozoides hiperpolarizaban

su membrana de - 40 a - 77 mV, aproximadamente. Este resultado estaba de acuerdo con las observaciones hechas en espermatozoides de ratón (Zeng, et al, 1995). Sin embargo, se tuvieron problemas en cuanto a la reproducibilidad de los resultados y un estudio más acucioso demostró que las condiciones de capacitación no fueron correctas ya que el volumen del medio (1-2 ml) era pequeño y las células ( $1 \times 10^8$ ) agotaban la glucosa en 4 horas.

Al medir el potencial de membrana por fluorescencia en medio amortiguado con HEPES, las células se encontraban con glucosa nuevamente, y era esta glucosa la que provocaba la hiperpolarización. En efecto, al medir el potencial de membrana de las células en medio sin glucosa, la adición de glucosa produjo un apagamiento en la fluorescencia consistente con una hiperpolarización.

Es necesario mencionar que el colorante utilizado para detectar el potencial de membrana empleado es positivo y permeable a través de las membranas. Cuando se presenta una hiperpolarización hay un influjo del colorante que lo acumula al interior de la célula, y provoca la formación de dímeros no fluorescentes (Wagooner, 1979). A mayor potencial negativo, mayor captación y mayor apagamiento de la fluorescencia. A medida que se despolariza la célula el colorante se desplaza hacia el medio, disminuyendo la concentración de dímeros no fluorescentes, y consecuentemente incrementando la

fluorescencia. Al ser el colorante permeable a través de la membrana, se puede detectar también el potencial de organelos internos como en este caso la mitocondria. En este caso, se requirió identificar una posible contribución del potencial de la mitocondria ya que la glucosa, vía la generación de NADH podría estimular la actividad mitocondrial y provocar la acumulación del colorante, apagando su fluorescencia.

Los resultados de esta tesis mostraron que la glucosa más bien hiperpolariza la membrana plasmática y que esta hiperpolarización está relacionada con la vía metabólica glucolítica. La glucólisis genera ATP que, estimula entre otros procesos, una ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La actividad de esta bomba es electrogénica (se introducen 2 átomos de potasio y se exportan 3 de sodio) y se genera una hiperpolarización que contribuye enteramente a la hiperpolarización inducida por la glucosa.

El presente trabajo tiene como propósito tratar de incorporar datos necesarios e importantes en el descubrimiento, análisis y entendimiento de la fisiología del espermatozoide humano que pueden ser importantes en los mecanismos de la fecundación.

### III. OBJETIVOS.

El objetivo general fue estudiar el efecto del metabolismo de la glucosa sobre el potencial de membrana y la concentración del calcio intracelular en espermatozoides humanos incubados en medio sin glucosa. De este tema general se desprenden los siguientes objetivos particulares.

- 1) Determinar el efecto del metabolismo de la glucosa sobre el potencial de membrana en presencia de inhibidores mitocondriales (rotenona, antimicina A y cianuro) y un desacoplante mitocondrial (CCCP). Este objetivo se planteó para discernir entre los efectos de la glucosa sobre el potencial de membrana mitocondrial o de membrana plasmática.
- 2) Determinar si el efecto de la glucosa se presenta como consecuencia de su metabolismo. Para ello se usaron sustratos metabolizables como la fructosa y manosa y un sustrato no metabolizable como la 2-desoxi-glucosa y un inhibidor de la glucólisis en NaF.
- 3) Determinar los mecanismos de transporte iónico que participan en el efecto de la glucosa. Dado que se probó que la glucosa indujo una hiperpolarización, se investigó si esta se debía a una activación de canales de potasio, cloruro o a la ATPasa,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Se Investigaron los efectos en presencia de TEA (bloqueador del canal de potasio), ácido niflúmico (bloqueador de canal de cloro), ouabaina (inhibidor de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) y del calcio y potasio extracelular sobre la hiperpolarización inducida por glucosa.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Reactivos.**

Los reactivos utilizados para este desarrollo experimental fueron los siguientes. De *Molecular Probes*: ioduro de 3,3'-dipropiltiodicarbocianina (diISC<sub>3</sub>(5)), Fura -2-AM (acetoximetil ester). De *SIGMA*: DMSO (dimetil sulfoxido), BSA (albúmina sérica de bovino), HEPES y valinomicina. De *ICN*: ouabaina. Los carbohidratos, inhibidores mitocondriales y de la glucólisis, y las sales utilizadas para preparar los medios se compraron a *Merck* y *Baker*.

### **IV.2. Obtención y purificación de espermatozoides.**

Las muestras de semen humano fueron proporcionadas por 7 donadores sanos (con tres días de abstinencia sexual) de entre 20 a 26 años de edad. Estas muestras se seleccionaron bajo los parámetros del protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los parámetros establecen que la muestra presente: >50 millones de espermatozoides/ml de semen, > 50% motilidad y > 50% de viabilidad. Las muestras usadas tuvieron entre 50 y 200 millones de células por eyaculado. Las muestras de semen se mantuvieron durante 30 minutos en una incubadora con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire y a una temperatura de 37°C. La purificación de los espermatozoides se realizó mediante la separación de la muestra por un gradiente discontinuo de

percoll a 75% y 50% (pH 7.4, HEPES 10 mM y NaCl 150 mM) que permite la obtención de espermatozoides móviles y libres de plasma seminal y leucocitos. Las muestras se centrifugaron a 300 X g durante 20 minutos de acuerdo a lo establecido por Suárez et. al., 1986. El botón de espermatozoides obtenido se lavo en una solución de NaCl 117.5 mM, KCl 8.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM, Na-Lactato 19 mM, Na- Piruvato 0.25 mM, HEPES 25 mM a un pH 7.5-7.6, sin glucosa (medio 0glcHSM-H) y centrifugado a 300 X g durante 5 minutos. Al término de este lavado, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 1 ml de medio 0gluHSM-H. Las células se incubaron durante 40 minutos en presencia de Fura-2-AM (3 μM). Transcurrido este tiempo se retiró el excedente de Fura-2 con una última centrifugación (300 Xg por 5 minutos) en medio 0gluHSM-H.

Los espermatozoides cargados con Fura-2 se suspendieron en 25 ml de medio de capacitación sin glucosa. El medio contenía HSM-H con NaHCO<sub>3</sub> 25 mM en lugar del HEPES y BSA 3mg/ml (0glcHSM) ajustando el pH a 7.6-7.7, con burbujeo de CO<sub>2</sub> y se mantuvieron en una incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire y a una temperatura de 37°C. Se tomaron alícuotas de 2.5 ml del medio de HSM (que contenían alrededor de  $1 \times 10^7$  células) y se centrifugaron a 300 Xg durante 4 minutos. El botón (con aproximadamente  $1 \times 10^6$  espermatozoides) se resuspendido en la celda de registro, que contenía 2.5 ml de HSM-H+ 0.5 μM de

diSC<sub>3</sub>(5). La celda se mantuvo a 37°C y en agitación magnética constante (400 rpm).

### **IV.3. Detección simultánea del potencial de membrana y concentración del calcio intracelular.**

Para detectar el potencial de membrana se utilizó el colorante diSC<sub>3</sub>(5). Este colorante se distribuye a través de la membrana celular como respuesta a cambios en el potencial de membrana, observándose un incremento y/o decremento en la emisión de fluorescencia. El colorante diSC<sub>3</sub>(5) posee una carga positiva. Se difunde de manera a través de las membranas. Se introduce a la célula y forma agregados no fluorescentes en el citoplasma y en organelos internos como la mitocondria. Si las células se encuentran hiperpolarizadas se presenta un influjo del colorante, como consecuencia, la emisión de fluorescencia decrece. De manera inversa, cuando las células se despolarizan, se presenta un eflujo del colorante, se dispersan los agregados del colorante y se incrementa la emisión de fluorescencia.

Para realizar la detección simultánea del potencial de membrana y la concentración del calcio intracelular se utilizó un espectrofluorómetro PTI (Photon Technology Internacional) el cual consta de dos fotomultiplicadores (PMTs) situados uno frente al otro y a 90° respecto a la fuente de excitación de Xenon

(0.85 Hz). La señal del Fura-2 se excitó a dos longitudes de onda, de 340-380 nm, mediante la rotación automática de un monocromador y fue detectada con un filtro de interferencia de 488 nm colocado en uno de los PMT. Se obtuvo la relación (proporción) de fluorescencia de 340 a 380 nm. La fluorescencia del diSC<sub>3</sub>(5) se detectó de manera simultánea con un filtro de interferencia de 670 nm colocado en el segundo PMT. Se excitó a 600 nm con ayuda de una fuente adicional de luz (Tri -lite, WPI) colocado enfrente de la lámpara de Xenon. Ambas lecturas, la relación de fluorescencias del Fura-2 y la del diSC<sub>3</sub>(5) se obtuvieron a 0.8 Hz.

#### **IV.4. Calibración del potencial de membrana.**

La calibración del colorante diSC<sub>3</sub>(5) se realizó de acuerdo al método descrito por Linares -Hernández et al. (1998). Se calibró para mantener un valor que se utilizara como comparación si existió algún aumento o disminución de la señal. El potencial de membrana se calibró con un ionóforo de potasio (valinomicina 0.4  $\mu$ M) que lleva el potencial de membrana al equilibrio electroquímico del potasio ( $E_k = -71$  mV). En virtud de que el potencial de reposo es de alrededor de -40 mV, la valinomicina provoca una hiperpolarización (decremento en la emisión de fluorescencia). Después de la adición de valinomicina, el potencial de membrana se calibró con tres pulsos de potasio a

diferentes concentraciones (15mM, 15mM y 30 mM) que despolarizaron la membrana (aumento en la emisión de fluorescencia). La calibración del potencial de membrana se calculó con la fórmula  $F_x - F_{8.6} / F_{val} \times 100$  vs  $E_k$ , donde  $F_{8.6}$  es el valor registrado con la valinomicina en medio HSM ( $[K]_{ext}$  fue de 8.6 mM) y  $F_x$  es la fluorescencia obtenida por la adición de potasio externo (en presencia de valinomicina). El valor de  $E_k$  se obtuvo a partir de la Ecuación de Nerst,  $E_k = 61.54 \text{ mV} \log [K]_{int} / [K]_{ext}$ , donde  $[K]_{int} = 120 \text{ mM}$  (Linares-Hernández, et al 1998).

#### **IV.5. Calibración de la concentración del calcio intracelular.**

En ausencia de glucosa, la relación de fluorescencia obtenida del calcio basal se estabilizó en valores de entre 1.2-1.7 y fueron calibrados de acuerdo a lo propuesto por Grynkiewicz, M, Poenie y Tsien 1985 utilizando la siguiente ecuación:  $[Ca^{2+}] = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R) (F_{f380} / F_{b380})$ . El colorante Fura-2 AM se utilizó para seguir la relación de fluorescencia del  $Ca^{2+}$ . Se calibró en ausencia y presencia de este ión para establecer una relación de fluorescencia. Esto nos permitió estimar los aumentos o disminuciones en los valores de fluorescencia, como respuesta, a la adición de los reactivos utilizados para el estudio. La señal del Fura-2 se registró de la manera anteriormente explicada. El valor de  $R_{max}$  (radiometría máxima) y  $F_{b380}$  (fluorescencia máxima) se

determinaron por saturación de calcio con  $1\mu\text{M}$  de ionomicina (ionóforo de calcio) (Babcok, D. F., 1983), Rmin (radiometría mínima) y Ff380 (fluorescencia libre) fue determinado quelando el calcio del medio con EGTA (10 mM, de un stock 500 mM ajustado a pH 9) y la Kd (constante de disociación) empleada fue 240 nM (Grynkievycz, M, Poenie y Tsien 1985 ).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La figura 3 muestra el efecto de la glucosa sobre la concentración del calcio intracelular y el potencial de membrana de espermatozoides incubados en medio sin glucosa. Una vez equilibrados los valores de fluorescencia del colorante  $\text{diSC}_3(5)$  (lo cual ocurrió en 4 minutos en la mayoría de los experimentos) se adicionó a la celda de registro 2 mM de glucosa. Se observó un decremento en la emisión de fluorescencia que fue seguido, transcurridos los 4 minutos, de un incremento a los valores de reposo.

Partiendo de esta observación, se procedió a determinar si este decremento en la emisión de fluorescencia era el resultado del potencial de la membrana plasmática o de una contribución de la membrana mitocondrial, que al cargarse de manera negativa permitiría un influjo del colorante al interior de este organelo. Una hiperpolarización del potencial mitocondrial se esperaría como consecuencia de un aumento en sustratos mitocondriales producto de la glucólisis. Para determinar esta posible contribución se realizaron trazos en presencia de diferentes inhibidores de la cadena respiratoria que impiden la generación del potencial de la membrana mitocondrial y en presencia también de CCCP (desacoplante mitocondrial) que colapsa el potencial mitocondrial. Los inhibidores utilizados fueron los siguientes: rotenona, que evita la oxidación de sustratos vía una deshidrogenasa (ligada al NADH) bloqueando la transferencia

potencial de membrana, mV

-15 —

-71 —

$[Ca^{2+}]_i$ , nM

250 —

200 —

150 —

100 —

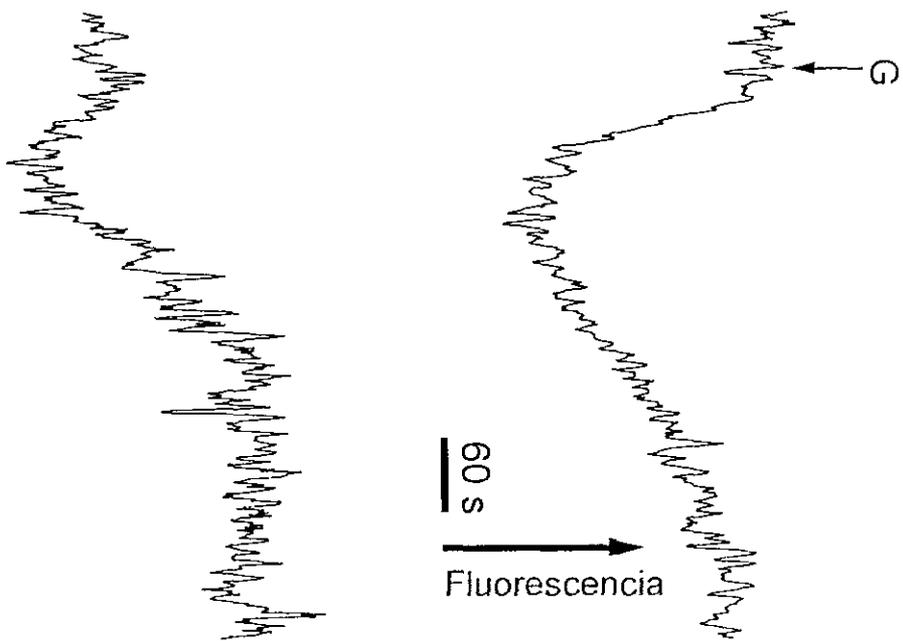


Figura 3. Apagamiento transitorio de la fluorescencia del colorante diSC<sub>3</sub>(5) inducido por glucosa. Se adicionó 2 mM de glucosa (G) a los 4 minutos de iniciado el experimento en la celda de registro que contenía 2.5 ml de medio OglcHSM-H + 0.5  $\mu$ M el colorante diSC<sub>3</sub>(5). Cuatro minutos después se observó un retorno de los valores de fluorescencia hasta alcanzar los iniciales. La valinomicina (1  $\mu$ M) se adicionó a los 11:30 min. Un minuto después se calibro el potencial de membrana con KCl. Se indican dos valores de calibración a la izquierda de los trazos. En el trazo de abajo se observa la detección simultánea de  $[Ca^{2+}]_i$

de electrones de FeS a ubiquinona (Sitio I), la antimicina A que inhibe la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c (Sitio II), y el cianuro que inhibe a la citocromo oxidasa (Sitio III). Como se puede observar en la figura 4A, la adición de estos inhibidores mitocondriales apenas si alteraron la fluorescencia del diSC<sub>3</sub>(5), lo cual sugirió que en estas condiciones la mitocondria no contribuyó al apagamiento de la fluorescencia y provocaron una inhibición de tan solo 15% sobre el decremento en la emisión de fluorescencia inducida por la glucosa.

Estos resultados sugirieron que el decremento en la emisión de fluorescencia es el resultado de un efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa y que la señal se debía fundamentalmente a la distribución transmembranal del colorante diSC<sub>3</sub>(5). Sin embargo, al evaluar la posible activación de la mitocondria por otro mecanismo, como lo es vía desacoplamiento mitocondrial con el protonóforo CCCP surgieron resultados inesperados.

El CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona) es un protonóforo desacoplante de la cadena respiratoria, que colapsa el gradiente de protones que se genera durante el transporte de electrones por la cadena respiratoria. El CCCP se adicionó a la celda de registro un minuto antes de la glucosa. Las observaciones mostraron que en presencia del CCCP la hiperpolarización

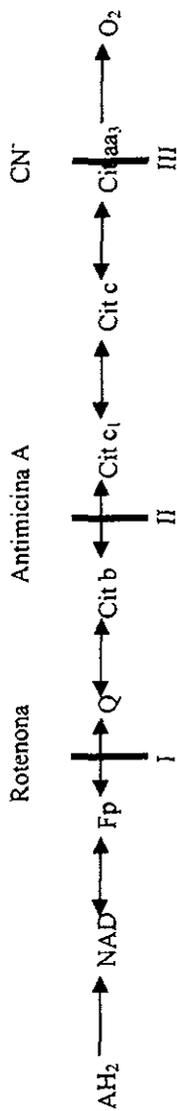


Figura 4A. Efecto de inhibidores mitocondriales sobre el decremento en la emisión de fluorescencia inducida por la glucosa. La adición de 0.4  $\mu\text{M}$  de rotenona (R), 2  $\mu\text{M}$  de antimicina A (A) y 1 mM de cianuro de sodio (CN) casi no modificaron el valor del potencial de reposo de la membrana. Cuando se adicionaron posteriormente los 2 mM de glucosa se indujo casi la misma disminución en la fluorescencia comparada con el control (sin inhibidores mitocondriales).

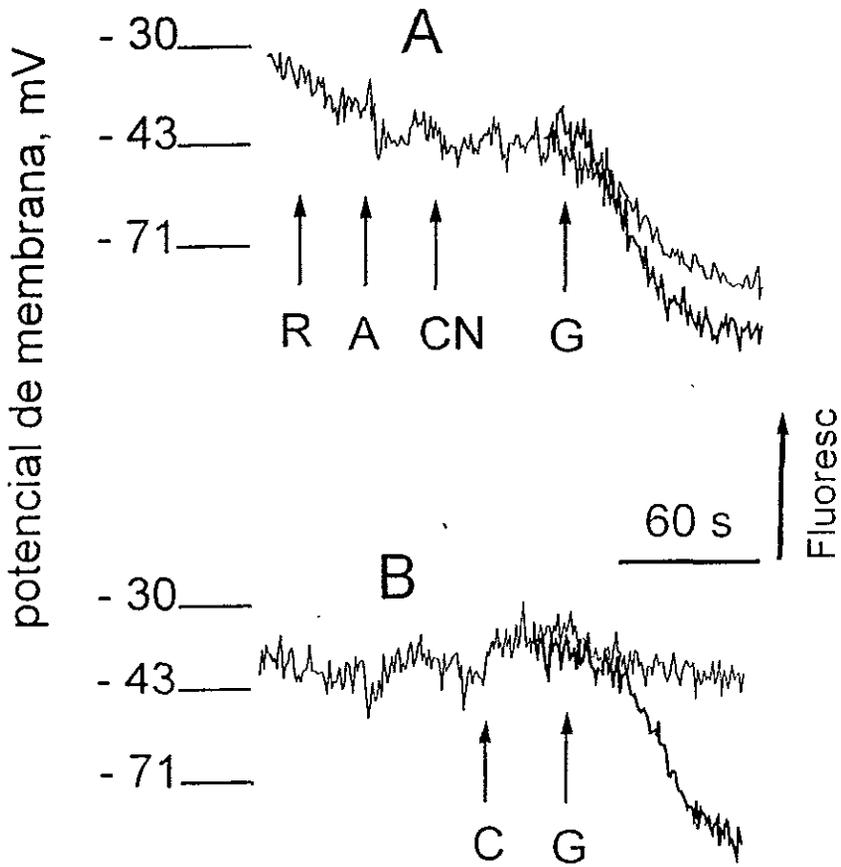


Figura 4A. Efecto de inhibidores mitocondriales sobre el decremento en la emisión de fluorescencia inducida por la glucosa. La adición de 0.4  $\mu$ M de rotenona (R), 2  $\mu$ M de antimicina A (A) y 1 mM de cianuro de sodio (CN) casi no modificaron el valor del potencial de reposo de la membrana. Cuando se adicionaron posteriormente los 2 mM de glucosa se indujo casi la misma disminución en la fluorescencia comparada con el control (sin inhibidores mitocondriales).

Figura 4B. Efecto del desacoplante CCCP sobre la emisión de fluorescencia del diSC3(5). La acción de 0.4  $\mu$ M CCCP (C) bloqueó el apagamiento en la fluorescencia inducido por la glucosa. El trazo sin desacoplante está en negrita.

inducida por la glucosa no se llevó a cabo (figura 4B) sugiriendo la posibilidad de que la señal generada por la glucosa tuviera un origen en el potencial de la mitocondria. Este resultado fue contradictorio, ya que se esperaba que el CCCP no tuviera ningún efecto de acuerdo a lo observado en presencia de los inhibidores mitocondriales.

Cabe hacer notar que el mecanismo de colapso del potencial de la membrana mitocondrial inducido por el CCCP y los inhibidores mitocondriales es radicalmente diferente. El CCCP actúa colapsando el gradiente de protones, dejando intacta la cadena de transporte de electrones. Este colapso se da a través de su actividad de ionóforo de protones tipo electrogénico (como sucede con la valinomicina con el ión potasio). Esta consideración nos llevó a suponer que el CCCP pudiera estar actuando también a nivel del potencial transmembranai, creando una permeabilidad de protones que al ser presuntamente mayor que la causada por la glucosa, la inhibiría, esto es, haría una especie de fijación de voltaje químico en un valor cercano al potencial de Nernst de distribución de protones ( $E_H$ ). Para verificar esta hipótesis se hicieron dos pruebas que determinaron si el CCCP alteraba el potencial de la membrana plasmática. Una de ellas fue determinar si el CCCP abría canales de calcio dependientes del voltaje, que se encuentran en la membrana plasmática. La figura 5 muestra que, en efecto, en espermatozoides previamente

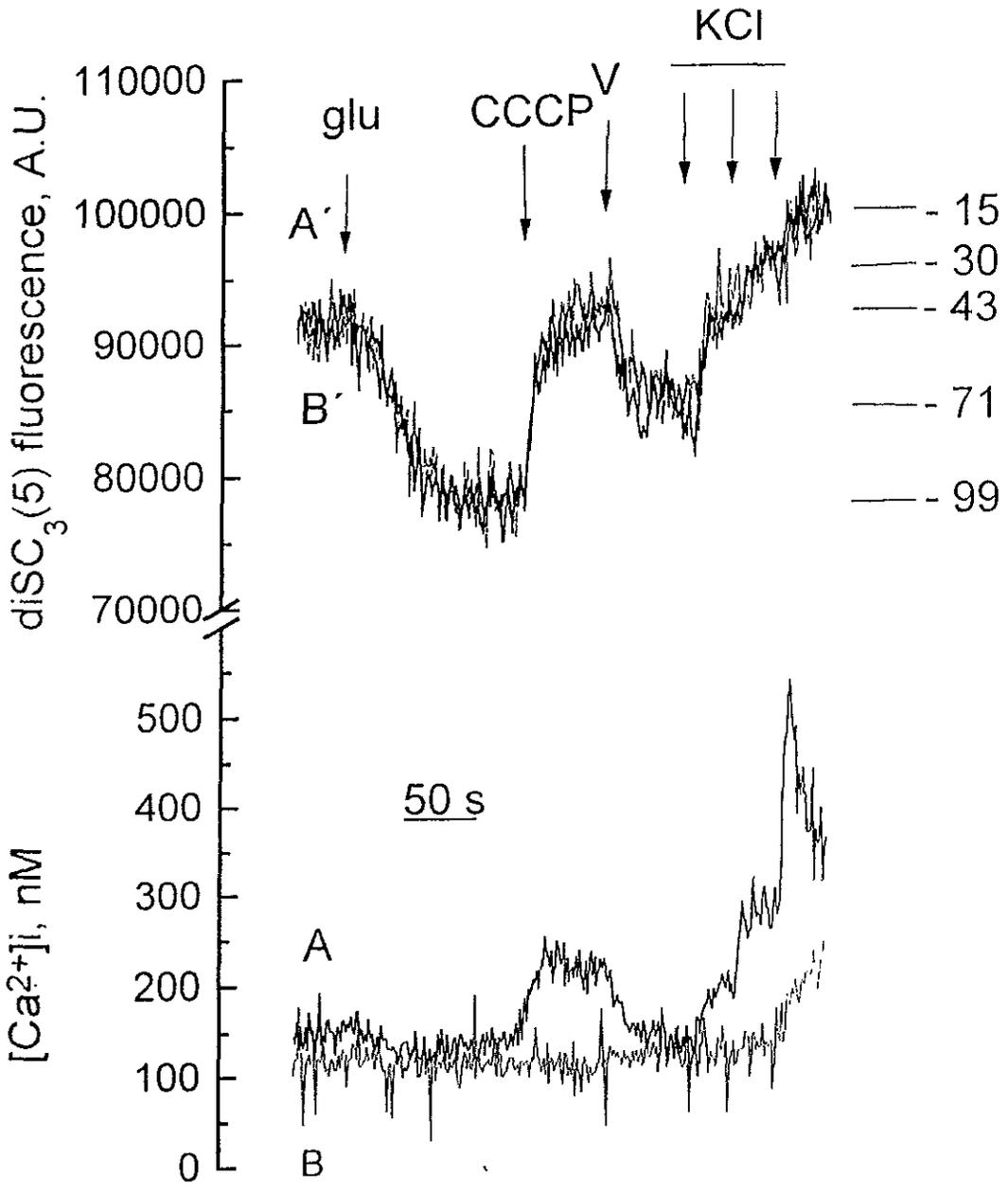


Figura 5. Efecto de 0.4  $\mu\text{M}$  de CCCP añadido a la celda de registro después de presentarse la hiperpolarización inducida por la glucosa sobre el potencial de membrana (A') y el calcio intracelular (A) detectados simultáneamente. El experimento se hizo también en presencia de 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  (trazos B y B')

hiperpolarizados con glucosa, el CCCP (0.4  $\mu\text{M}$ ) produjo un incremento en la fluorescencia consistente con una despolarización (alrededor de -36 mV<sub>i</sub>). De manera simultánea, se registró un incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que fue de una magnitud comparable al de una despolarización similar a la hecha con potasio. Este incremento en la concentración del calcio fue sensible a  $\text{NiCl}_2$  (600  $\mu\text{M}$ ), que bloquea canales de calcio dependientes de voltaje. Estos experimentos indicaron que el incremento en la fluorescencia inducida por el CCCP correspondió a una despolarización capaz de abrir canales de calcio dependientes del voltaje sensibles a níquel. El valor del potencial alcanzado con el CCCP fue muy cercano al  $E_H$  ( $E_H = -40 \text{ mV}$ ), considerando un  $\text{pH}_i$  6.9 y un  $\text{pH}_e$  de 7.55.

La segunda prueba fue investigar el efecto del CCCP en espermatozoides incubados en medio sin calcio, que es una condición en la que se sabe que el espermatozoide tiene un potencial despolarizado (Foresta, et al 1993), los flujos iónicos que despolarizan este potencial son desconocidos. En esta condición, si el  $E_H$  es más negativo que el potencial de reposo, el CCCP hiperpolarizaría. La figura 6 muestra que en efecto, este fue el caso: el CCCP hiperpolarizó a espermatozoides despolarizados en medio sin calcio. Esta hiperpolarización no produjo cambios en la concentración del calcio interno y

llegó a un valor muy cercano al  $E_H$ . Estos resultados confirmaron que, en efecto, el CCCP produce cambios en la permeabilidad de protones que cambian el potencial de membrana a valores cercanos al  $E_H$ . Consecuentemente, el efecto inhibitorio del CCCP sobre la hiperpolarización inducida por la glucosa, pudo deberse a que este ionóforo ejerció un efecto fijador de voltaje; en otras palabras, la permeabilidad de los protones producida por el CCCP debió ser mucho mayor que la permeabilidad iónica asociada a la hiperpolarización inducida por la glucosa. Estos resultados corroboraron que la glucosa tuvo un efecto hiperpolarizante en la membrana plasmática. La hiperpolarización inducida por la glucosa fue de alrededor de  $-35$  mV (de un potencial de reposo de  $-44 \pm 3.4$  mV, en ausencia de glucosa, a  $-77 \pm 5$  mV; ES,  $n=5$ ); con frecuencia se obtuvieron valores más negativos que el potencial electroquímico del potasio y, por ello, la posterior adición de valinomicina tuvo un efecto despolarizante (ver, por ejemplo, los trazos mostrados en la figura 4).

#### **¿La hiperpolarización que induce la glucosa requiere de su catabolismo?**

Para responder a esta pregunta se realizaron trazos en presencia de cuatro diferentes carbohidratos: la D(+)-Glucosa, D(-)-Fructuosa, que son metabolizables, y el carbohidrato 2-desoxi-D-glucosa que no lo es (Breitbart H. y L. Nass-Arden, 1995). La glucosa y la fructuosa provocaron prácticamente el

Membrane potential, mV

-15  
-30  
-43  
-71  
-87

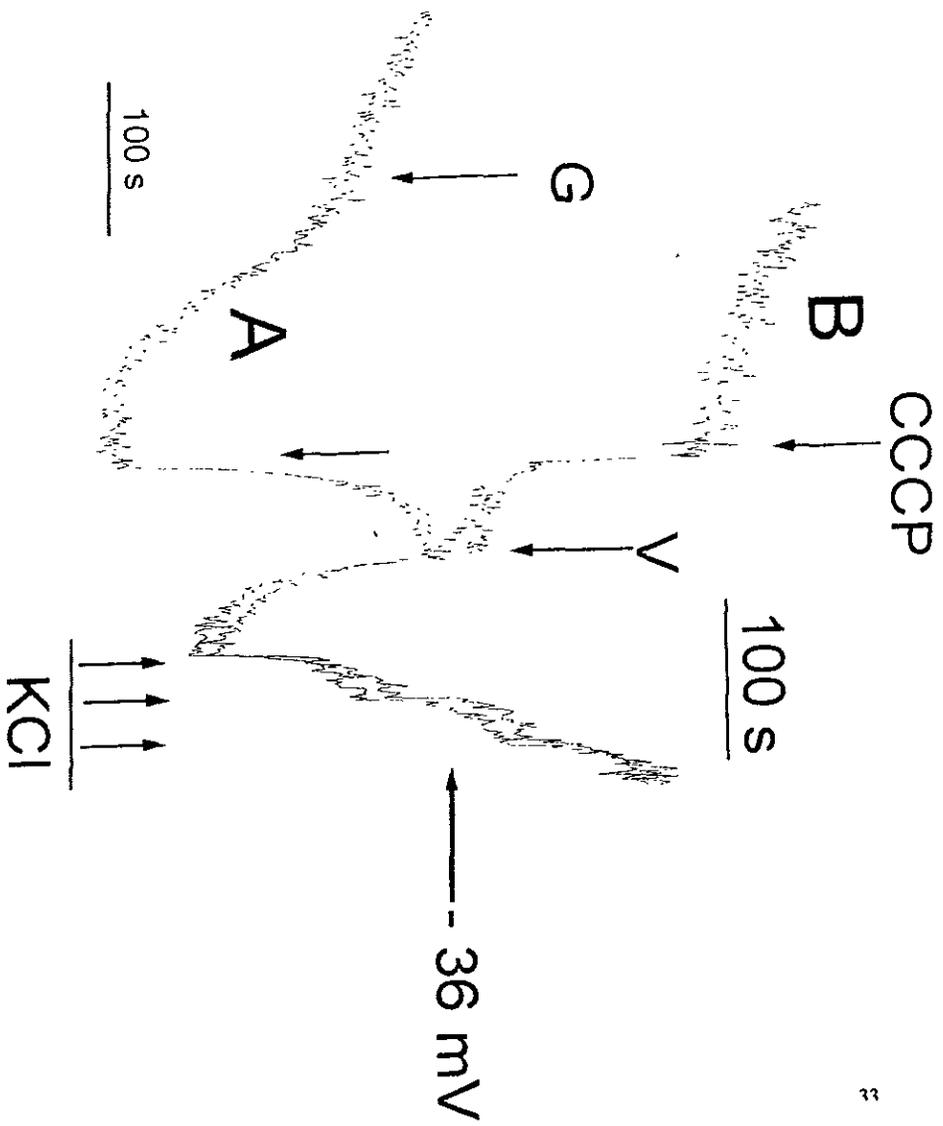


Figura 6. Efecto del 0.4  $\mu\text{M}$  CCCP en el calcio interno y el potencial de membrana de espermatozoides incubados en medio con bajo calcio (OglcHSM-H + 5 mM de EGTA) (B). Se muestra el trazo control (A) en medio con calcio y las calibraciones correspondientes con 0.4  $\mu\text{M}$  valinomicina (V) y KCl (K) 15, 15 y 30 mM. El valor señalado a - 36 mV es el que se alcanzó en ambos casos al añadir CCCP.

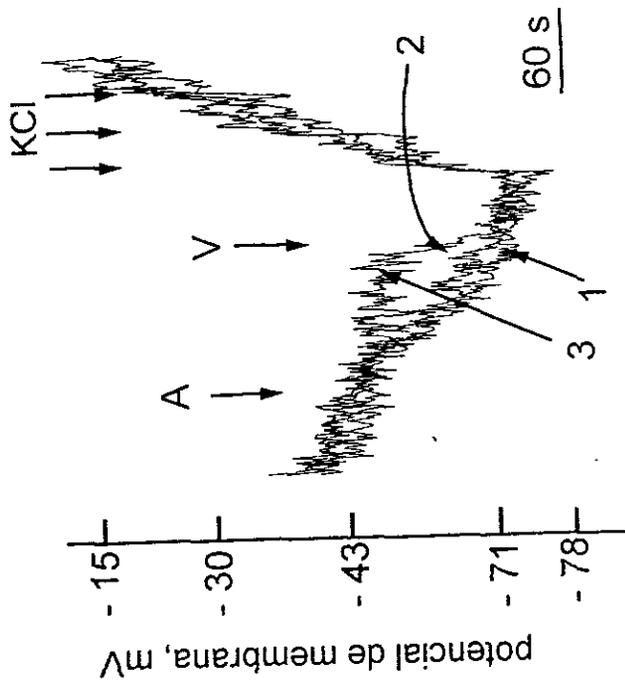


Figura 7. Efecto de 3 diferentes azúcares sobre el potencial de reposo de la membrana del espermatozoide humano. Se adicionó 2 mM de glucosa (1), fructosa (2) y 2-desoxiglucosa (3) a la celda de registro con 2.5 ml de medio 0glcHSM-H + 0.5  $\mu$ M de diSC3(5). La valinomicina fue añadida posteriormente y un minuto después se hizo una calibración del potencial de membrana con tres adiciones sucesivas de KCl (15, 15 y 30 mM).

mismo efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana, mientras que la 2-desoxi-D-glucosa, no causó efecto alguno (figura 7). La 2-desoxi-glucosa se transporta a las células y puede fosforilarse por la hexocinasa, pero no se realiza el siguiente paso catalítico (Devlin T.M.). Este resultado indicó que se requiere de la hidrólisis de la glucosa para que se induzca la hiperpolarización. El efecto hiperpolarizante producido por los diferentes carbohidratos (excepto la 2-desoxi-glucosa) apoya la hipótesis de que la utilización de la glucosa por el espermatozoide es la principal fuente de energía metabólica para la síntesis de ATP.

Con la intención de explorar si la metabolización de la glucosa sirve como fuente de energía causante de la hiperpolarización, se estudió el efecto de inhibidores de la glucólisis en la hiperpolarización inducida por glucosa. Paralelamente, se intentó establecer una correlación con la motilidad del espermatozoide.

La motilidad se siguió mediante observación directa al microscopio. La adición de 2 mM de glucosa y del inhibidor de la glucólisis fue simultáneo. Se realizó una estimación porcentual de la motilidad comparadas con el control. Se incubaron los espermatozoides durante 10 minutos a distintas concentraciones (2, 6 y 10 mM) de cada bloqueador de la glucólisis: NaF. El fluoruro es un inhibidor de la enzima enolasa, la cual es responsable de catalizar la reacción de

2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (Devlin T.M). Los resultados mostraron que a concentraciones bajas de NaF, desde 2 mM hasta 10 mM, la motilidad de los espermatozoides disminuyó considerablemente (tabla 1). Alrededor de un 95% de los espermatozoides observados en el campo se encontraban prácticamente inmóviles, en todos los tratamientos aplicados. Esta inmovilidad se ve relacionada con la falta de formación de moléculas de ATP necesarias para que la cabeza de la proteína accesoria dineína interactúe con los microtúbulos adyacentes muevan y permitan el movimiento del flagelo, de igual forma, en ausencia de glucosa la motilidad del espermatozoide se ve prácticamente anulada. Una vez observados los efectos del NaF sobre la motilidad de los espermatozoides se procedió a estudiar el efecto sobre el potencial de membrana.

El efecto del NaF sobre la hiperpolarización inducida por la glucosa fue claramente inhibitorio (figura 8). La concentración de fluoruro que produjo una inhibición del 50 % fue  $1.3 \pm 0.4$  mM (ES, n=4). Estos resultados concuerdan con el efecto del NaF sobre la motilidad y sugieren que la metabolización de la glucosa causa la hiperpolarización.

Tabla 1. Efecto de la concentración de dos inhibidores de la glucólisis (ASO4 y NaF) sobre la motilidad del espermatozoide humano.

TRATAMIENTO	MOTILIDAD %		
	2 mM	6 mM	10mM
Control (2 mM glucosa)	80		
HSM-H (sin glucosa)	0		
ASO4	70	60	50
NaF	20	10	5
ASO4 + NaF	1	5	10

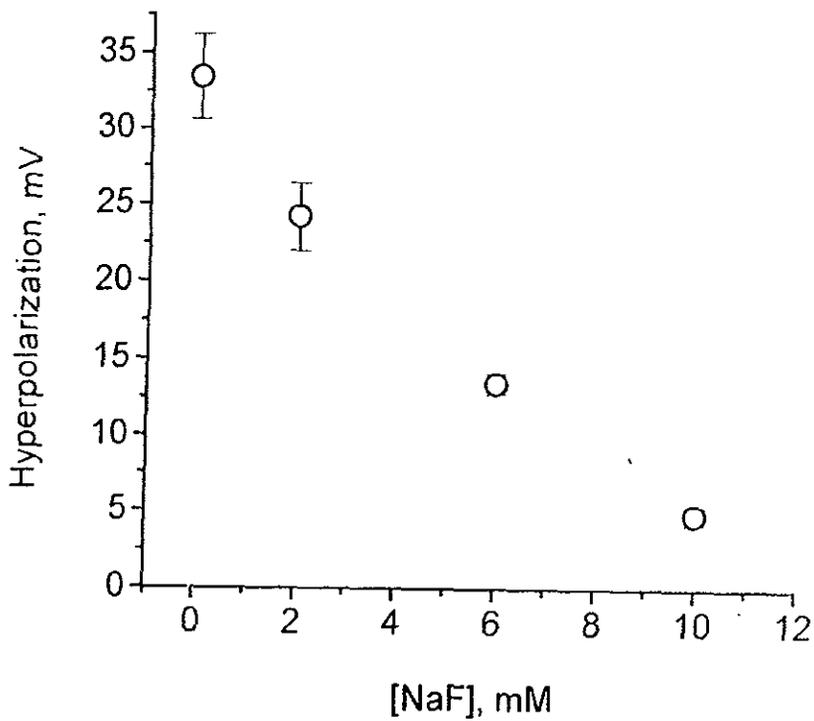
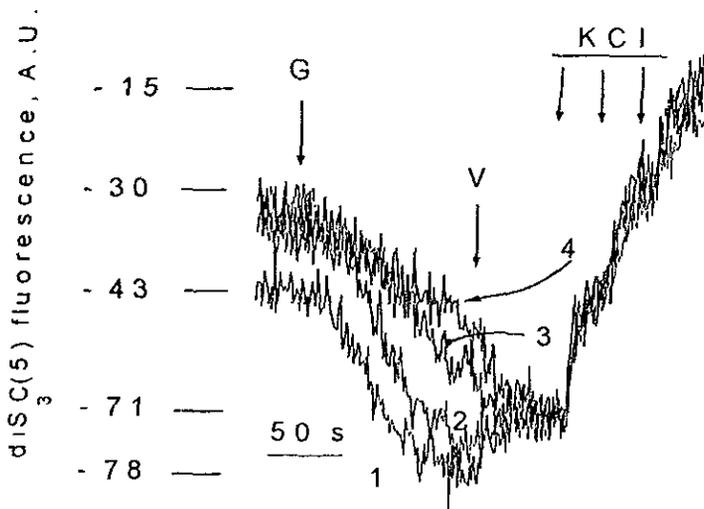


Figura 8. Efecto del NaF (inhibidor de la glucólisis) sobre la hiperpolarización inducida por la glucosa. Se adicionaron concentraciones de 2 (1), 6 (2) y 10 (3) mM de NaF del desde el inicio del experimento a la celda de registro con 2.5 ml de medio 0glcHSM-H + 0.5  $\mu$ M del colorante diSC3(5). La glucosa (2 mM) fue añadida a los 4 minutos de comenzado el experimento. La gráfica muestra la curva de inhibición a las diferentes concentraciones de NaF. Las barras son errores estandar con una n=4.

### **Permeabilidades iónicas que participan en la hiperpolarización inducida por la glucosa.**

Se analizaron los mecanismos de transporte iónico que participan en el efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa. Para ello estudiamos el potencial de membrana y el calcio interno en medio con diferente composición iónica y en presencia de inhibidores de canales iónicos. En primer lugar, se examinó si la hiperpolarización se debía a un aumento en la permeabilidad de potasio a través de canales de potasio. En la Figura 9 se muestra un trazo que se realizó en el medio (HSM) con elevado  $[K^+]$  externo (68 mM).

Si la hiperpolarización se debiera a una activación de los canales de potasio, la elevación en la concentración de potasio externo inhibiría la hiperpolarización, ya que el potencial electroquímico de potasio es de -15 mV. Como se muestra en la figura 9 este no fue el caso, en presencia de 68 mM de KCl externo la hiperpolarización inducida por la glucosa no se modificó. Además, 20 mM de cloruro de tetraetilamonio (TEA), un bloqueador de los canales de potasio no modificó la hiperpolarización (figura 9). Los tres pulsos de  $K^+$  adicionados posteriormente para realizar la calibración resultan ser evidentes por el efecto de la valinomicina (ionóforo).

Asimismo, 50  $\mu$ M de ácido niflúmico, que es un bloqueador de canales de  $Cl^-$  tampoco tuvo un efecto diferente al observado en el trazo control (figura 9).

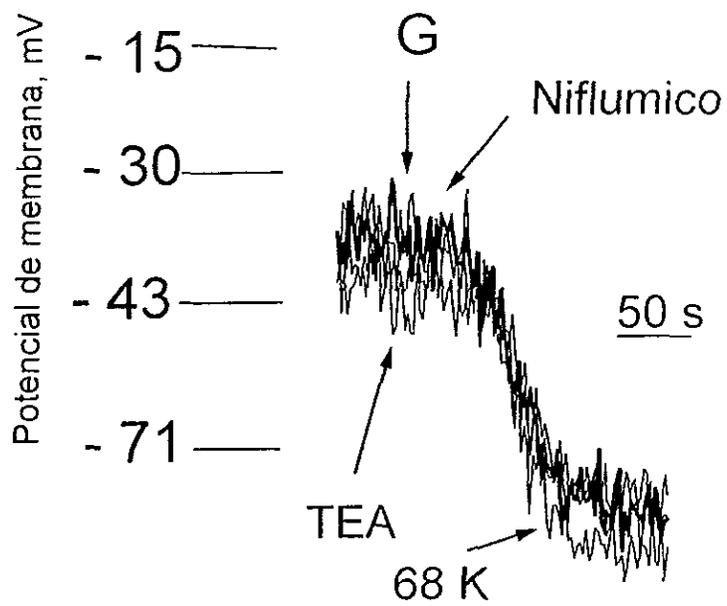


Figura 9. Permeabilidades iónicas involucradas en la hiperpolarización del potencial de membrana. El trazo control (trazado en negrita) es comparado con los observados en medios con: (1) alta concentración extracelular de KCl (68.6 mM), (2) TEA (10 mM), bloqueador específico de los canales de  $K^+$  y (3) ácido niflúmico (bloqueador de canales de  $Cl^-$ ) 50  $\mu$ M. Estas sustancias se añadieron desde el inicio del experimento (4 minutos antes de la adición de 2 mM de glucosa (G)).

En resumen, la hiperpolarización inducida por la glucosa en la presencia de ácido níflúmico, 68 mM de KCl o 10 mM de TEA fue de  $28 \pm 5$ ,  $29 \pm 3$  y  $28 \pm 5$  mV (SE, n=4) respectivamente. Estos valores fueron estadísticamente iguales al valor control que fue de  $31 \pm 4$  mV (SE, n=4).

Estos resultados descartan una posible activación de canales de  $K^+$  que estuvieran participando en la hiperpolarización del potencial de membrana al metabolizarse la glucosa. También sugiere que no existe una activación de canales de cloro durante la hiperpolarización inducida por la glucosa

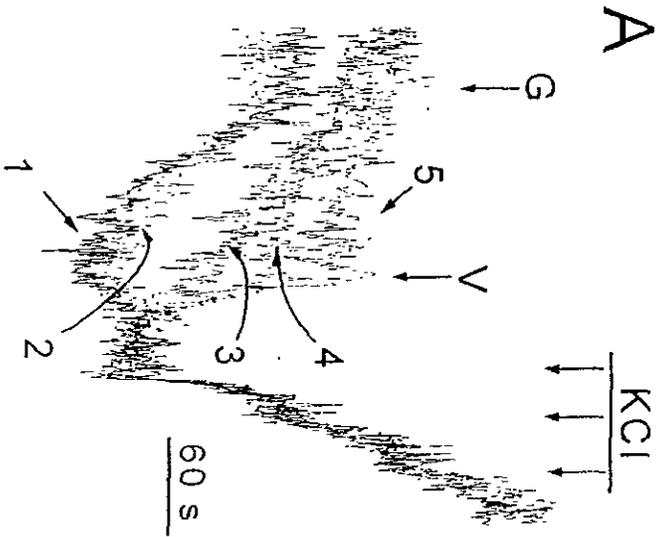
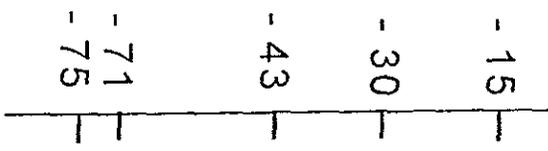
#### **Papel de la ATPasa $Na^+/K^+$ en la hiperpolarización inducida por la glucosa.**

Se investigó si la ATPasa  $Na^+/K^+$  participaba en la hiperpolarización inducida por la glucosa. Un antecedente importante indicaba que en células durante el desarrollo de la ascitis esta enzima es capaz de generar un potencial de -70 mV (Bashford, 1985) en virtud de su intercambio electrogénico. Cabe recordar que durante el reposo la distribución de las cargas de los iones  $K^+$  y de  $Na^+$  se mantienen constantes por transporte activo, el cual utiliza más de 1/3 de la energía metabólica disponible (ATP) para introducir 2K y sacar 3Na. Este transporte electrogénico de los iones  $Na^+$  y  $K^+$  es catalizado por la ATPasa de  $Na^+/K^+$ .

Para evaluar el papel de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la hiperpolarización inducida por la glucosa se utilizó el inhibidor ouabaina. La ouabaina es un glucósido cardiaco que bloquea la actividad de esta ATPasa. La ouabaina inhibe a la adenosintrifosfatasa que sólo es catalíticamente activa en el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna (Wallick, E. T., et al., 1980, Askari, A. 1982). La ouabaina se adicionó a la celda de registro desde el inicio del experimento. Se compararon los trazos a diferentes concentraciones de ouabaina con uno control en ausencia de este bloqueador. Los resultados mostraron que la ouabaina inhibe por completo la hiperpolarización inducida por la glucosa (figura 10). La concentración del inhibidor que produjo una inhibición del 50 % fue de alrededor de 700 nM, que es una concentración que concuerda con el efecto inhibitorio de la ouabaina sobre la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  encontrada en otros sistemas (Robinson y Flashner, 1979). Este resultado indica que la hiperpolarización se debe a la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

Una vez observada la contribución de esta bomba a la hiperpolarización del potencial de membrana inducida por la glucosa, se procedió a realizar experimentos con algunas variantes para confirmar la participación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Se adicionó ouabaina (3  $\mu\text{M}$ ) a las células 2 minutos después de inducida la hiperpolarización por la glucosa con la idea de inhibir a la bomba y provocar una depolarización. Si la hiperpolarización se debía a una activación de la

Potencial de membrana, mV



Hiperpolarización, mV

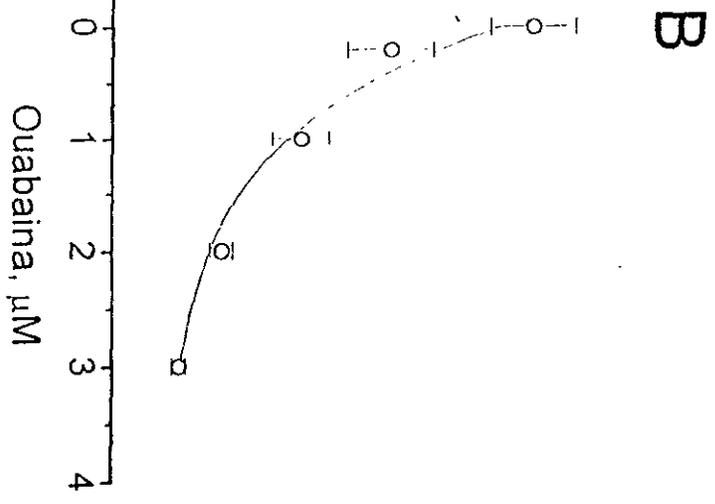
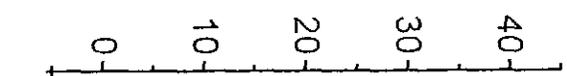


Figura 10. Inhibición de la hiperpolarización inducida por la glucosa (G) por ouabaina. La ouabaina se añadió desde el principio del trazo (4 minutos de incubación) (A). Las concentraciones añadidas fueron: 1) 0, 2) 0.2  $\mu\text{M}$ , 3) 1  $\mu\text{M}$ , 4) 2  $\mu\text{M}$  y 5) 3  $\mu\text{M}$ . La valinimicina (V, 0.4  $\mu\text{M}$ ) y KCl (15, 15 y 30 mM) se añadieron como se indica. En B se muestra la gráfica de la curva de inhibición de la hiperpolarización dependiente de la concentración de ouabaina. Las barras son errores estandar con una  $n=4$ . La concentración de ouabaina que inhibió un 50 % de la respuesta máxima fue 700 nM.

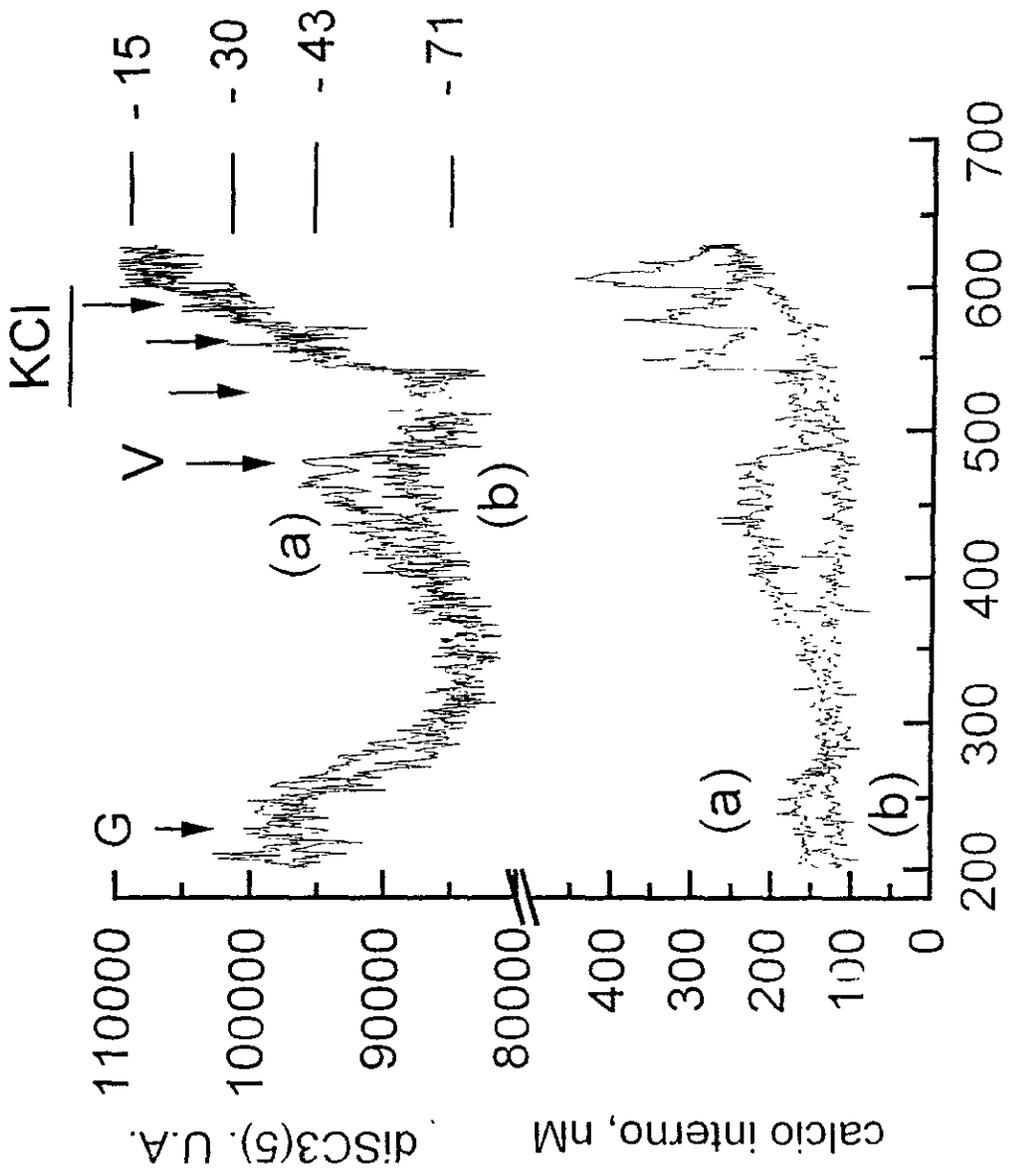
ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , la ouabaina debería causar una despolarización. La figura 11 muestra que, en efecto, este fue el caso, ya que la ouabaina despolarizó la membrana hasta alcanzar los valores del potencial de reposo, presumiblemente debido al bloqueó de la contribución hiperpolarizante de la bomba. De manera simultánea a la despolarización provocada por la ouabaina se observó un incremento en la concentración del calcio interno (figura 11) que probablemente fue un reflejo de la apertura de los canales de calcio dependientes del voltaje. El incremento en la concentración del calcio interno inducido por la ouabaina se bloqueó con  $600 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ , que bloquea los canales de calcio dependientes del voltaje. Por otra parte, la adición de  $\text{Ni}^{2+}$  también inhibió la despolarización inducida por la ouabaina. Estos resultados podrían sugerir que el  $\text{Ni}_2^+$  afecta, de alguna manera, la interacción entre la ouabaina y la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

Con los resultados obtenidos se pudo corroborar que la ouabaina, al bloquear la actividad de la ATPasa, despolariza la membrana (previamente hiperpolarizada por la adición de glucosa) y que esta despolarización por consecuencia promovió un influjo de calcio dependiente de voltaje.

Se hicieron más experimentos para explorar el papel de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la hiperpolarización inducida por la glucosa. Como sabemos que en medio sin potasio externo esta ATPasa no puede intercambiar iones, decidimos probar el efecto de la glucosa en medio sin potasio. De acuerdo a esta hipótesis, en

ausencia de potasio externo la hiperpolarización inducida por la glucosa no se presentó (Figura 12). Cuando se adicionó 1 mM de KCl a la celda, que es una cantidad que satura a la bomba (Robinson y Fleshner, 1979), la hiperpolarización se disparó a valores similares al trazo control, esto es, en 1 mM de KCl presente desde un principio (figura 12). La hiperpolarización inducida con potasio después de tratar con glucosa se inhibió con 3  $\mu$ M de ouabaina (figura 12). Estos resultados indican que la presencia del potasio es indispensable para que se lleve a cabo la hiperpolarización iniciada por la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

Integrando los resultados obtenidos podemos sugerir el siguiente mecanismo. En medio sin glucosa el espermatozoide tiene un potencial de alrededor de - 40 mV. Al añadir la glucosa, ésta se transporta, se metaboliza y genera ATP. El ATP producido incrementa la actividad de la ATPasa que, en virtud de que cataliza un intercambio electrogénico (se exportan 3  $\text{Na}^+$  y se importan dos  $\text{K}^+$ ) hiperpolariza alrededor de 30 mV. Esto implica que en ausencia de la glucosa el contenido de ATP debe ser limitante para la acción de esta ATPasa. La hiperpolarización llega a un valor mínimo y en minutos las células vuelven a despolarizarse a su valor de reposo original, esto es alrededor de - 40 mV. Es posible que esta despolarización se deba a la activación de canales iónicos también dependientes de ATP que disminuyen la resistencia membranal.



disc3(5). U.A.

Figura 11 Efecto de la ouabaina sobre el potencial de membrana y el calcio interno de espermatozoides hiperpolarizados con glucosa. En las curvas (a) la ouabaina ( $3 \mu\text{M}$ ) se adicionó a la celda de registro dos minutos después de presentarse la hiperpolarización inducida por  $2 \text{ mM}$  glucosa. El trazo (b) muestra el mismo experimento pero en presencia de  $600 \mu\text{M}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ . En ambos experimentos se muestra la calibración con valinomicina (V,  $1 \mu\text{M}$ ) y las tres cantidades sucesivas de KCl ( $15$ ,  $15$  y  $30 \text{ mM}$ ).

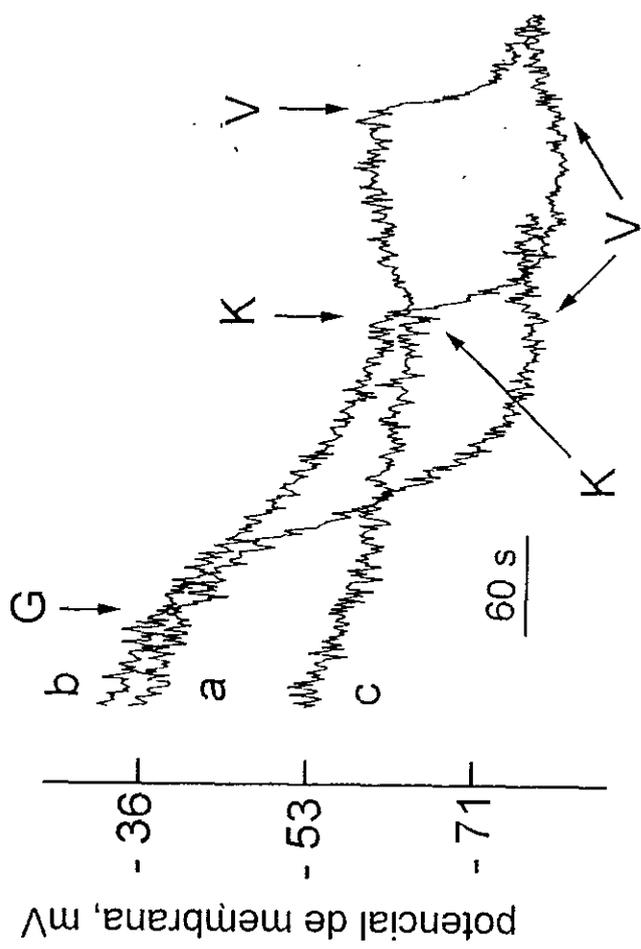


Figura 12. Efecto de la glucosa sobre el potencial de membrana en espermatozoides incubados en un medio sin potasio. El trazo A muestra el registro de espermatozoides incubados en 0glc-HSM-H con 1 mM de K<sup>+</sup> (control). El trazo B se encuentra en las mismas condiciones pero en medio sin potasio. Donde se indica se añadió 1 mM de KCl. El trazo C es igual al trazo B pero en presencia de 3  $\mu$ M de ouabaina. Se adicionó 1 mM de KCl y un minuto después se añadió 0.4  $\mu$ M de valinomicina.

Un medio ausente de glucosa no resulta ser una condición fisiológica. Un aporte exógeno de glucosa puede estar disponible en el tracto genital femenino, además, del contenido en el plasma seminal (Povoa, et al., 1986) En espermatozoides sanos no se ha encontrado una relación entre disminución de glucosa e inhibición de la reacción acrosomal, debido a que los espermatozoides no se hubieran capacitado. En condiciones patológicas (astenozoopermia y azoospermia) la ausencia de cualquier tipo de carbohidrato disminuye la motilidad. La adición posterior de fructuosa incrementa el número de espermatozoides móviles (Patel, et al., 1988). Lo que sí se encuentra documentado es que en ausencia de este carbohidrato es imposible que se lleve a cabo la hiperactividad, requisito indispensable para la fecundación del ovocito (Mahadevan, et al., 1997).

## VI. CONCLUSIONES.

1. En un medio sin glucosa, la adición de 2 mM de este carbohidrato induce una hiperpolarización sobre el potencial de membrana.
2. El efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa es transitorio (aproximadamente en 11 minutos), tendiendo a regresar a los valores iniciales del potencial de membrana en reposo. Las causas que restablecen estos valores no se estudiaron.
3. El desacoplante CCCP provoca un influjo de protones que es capaz de cambiar el potencial de membrana, abriendo se canales de calcio dependientes de voltaje. De igual forma, actúa como un protonóforo, fijando el potencial de membrana a valores cercanos al  $E_H = -40$  mV.
4. El efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa representa una contribución transmembranal como resultado del transporte del colorante  $diSC_3(5)$  a través de la membrana celular.
5. El efecto hiperpolarizante se induce vía el metabolismo de la glucosa. La glucosa y la fructosa inducen hiperpolarización, la 2-desoxi-glucosa que no es metabolizada, no la induce.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6. El compuesto NaF inhibe el efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa. Este resultado demuestra la dependencia de la glucólisis sobre la hiperpolarización.

7. El desacoplante CCCP provoca una despolarización del potencial de membrana y un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje que se bloquea completamente en presencia de  $600 \mu\text{M}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ .

8. Los canales de  $\text{K}^+$  o  $\text{Cl}^-$  no participan en la hiperpolarización inducida por la glucosa.

9. El efecto hiperpolarizante inducido por la glucosa se inhibe completamente en presencia de ouabaina. Debido a que este glucósido es un bloqueador específico de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , se concluye que este efecto se debe al intercambio electrogénico de la bomba ( $3 \text{Na}^+$  por  $2 \text{K}^+$ ) y que un aumento en la concentración de ATP, producto de la glucólisis, aumenta la actividad de la bomba, hiperpolarizando las células.

10. De manera consistente a la hipótesis anteriormente mencionada, en un medio sin  $\text{K}^+$  no se presenta la hiperpolarización en presencia de glucosa.

## VII. LITERATURA CITADA.

- Askari, A y Huang W. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: Evidence for the binding of ATP to the phosphoenzyme. 104 (1982)1447-1453.
- 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 (1983) 6380-6389.
- Bashford, C.L. Pasternak, C.A. Generation of a plasma membrane potential by the Na<sup>+</sup> pump coupled to proton extrusion, Eur. Biophys. J. 12 (1985) 229-235.
- Bleid, J P., Grave J.M., Wassarman P.M. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance and binding of acrosome reacted sperm. Devel. Biol. 128 (1988) 376-385
- Bleid, J.P., and Wassarman, P.M. Identification of a ZP<sub>3</sub>-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. Proc. Natl. Acad. Sci 87 (1990) 5563-5567
- Breitbart, H. y L. Nass-Arden. Relationship between intracellular calcium, energy metabolism, and motility of ram sperm. Archives of Andrology. 35 (1995) 83-92
- Brewis, I. A. y Moore H. D. M. Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. Hum. Reprod. (1997). Suppl. JBFS 2:2, 156-165
- Devlin, T.M., Editor, Textbook of Biochemistry with clinical correlation, 3<sup>rd</sup>. edition, Wiley-Liss.

- Florman, H. M., 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. *Developmental Biology* 152 (1992) 304-314.
- Foresta, C. Rossato, M y Di Virgilio F. Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J.* 294 (1993) 279-283.
- García-Soto, J. González-Martínez, M. T., De La Torre L, y Darszon A. internal pH regulate  $Ca^{2+}$  uptake and the acrosome reaction in sea Urchin sperm. *Dev. Biol.* 120 (1987) 112-120.
- Gilbert, S. F. 1992. *Biología del desarrollo*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, Martin, D. W., et al., 1990. *Bioquímica de Harper*. Editorial El Mundo Moderno, S.A. de C.V., México, D.F, 750 p.p.
- Gong, X.H., Dubois, D.H., Miller, D.J., and Shur, B.D. Activation of a G protein complex by aggregation of  $\beta$  - 1,4, galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science.* 269 (1995) 1718 -1721.
- Grudzinskas, J. G. y J. L. Yovihc. 1995. *Gametes - The oocyte*. Cambridge University Press. 441 p.p.
- Grynkiewicz, Poenie, M., Tsien R. Y. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440-3450.

- Hille, B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 607 p.p.
- Linares-Hernandez, L., Guzman-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J., y González-Martínez, M. T. Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potencial. *BBA*. (1998).
- Leyton, L. and Saling, P.M. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP<sub>3</sub> triggers the acrosome reaction *Cell. Biol.* 108 (1989) 2163-2168.
- Mahadevan, M. M, Miller, M. M, and Moutos, D. M. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. *Hum. Reprod.* 12 (1997) 119 –123.
- Mendoza, C. y Tesarik, J. A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS*.(1993).
- Miller, D.J., Macek, M.B., and Shur, B.D. Complementarity between sperm surface  $\beta$  - 1,4, galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm egg binding. *Nature*. 357 (1992) 589-593.
- Mujica, A., R. Moreno-Rodriguez, J. Naciff, L. Neri and J. S. Tash. Glucose regulation of guinea-pig sperm motility. *92* (1991) 75-87.

- Patel, S.M., Skandhan, K. P., Mehta, Y.B. Seminal plasma fructose and glucose in normal and pathological conditions. *Acta Eur. Fertil.* 19, 6 (1988) 329 – 32.
- Povia, H. Jr., Bastos, J.J., Silva, M. E., Ariza, A., Moraes, M. I., Rodrigues, R. B., and Silva, M.S. Glucose in human semen. *Biomed. Biochim. Acta.* 45 (1986) 685 – 5.
- Robinson, J, Flashner, M.S. The ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-activated ATPase. Enzymatic and transport properties, *Biochim. Biophys. Acta* 549 (1979) 145-176.
- Sneil, W. J. y White, J. M. The molecules of mammalian fertilization. *Reivew. Cell.* 85 (1996) 629-637.
- Suárez, S. S., Wolf, D. P. y Meizel, S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Research.* 14 (1986) 107-121.
- Van Dop, C., Hutson, S. M., y Lardy H. A. Pyruvate metabolism in Bovine epididymal spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry.* 252, 4 (1977) 1303-1308.
- Wagoner, A. S. Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev Biophys. Bioeng.* 8 (1979) 47 – 68.
- Wallick, E. T. Pitts, B. J. R., Lane, L. K. Y Schwartz, A A kinetic comparison of cardiac glycoside interactions with  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPases from skeletal and cardiac muscle and from kidney 202 (1980) 442-449.

- Wassarman, P.M. Cellular and molecular elements of mammalian fertilization. In: Dale B, ed. Mechanisms of fertilization. Berlin: Springer-Verlag. (1991) 305-314.
- White, D. R. y Aitken R. J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. Gamete Research. 23 (1989) 163-177.
- Zeng, Y Clark, E. N., y Florman H. M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal reaction. Dev. Biol. 171 (1995) 107-121.