

00591 7

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización de Canales de K⁺ en Células
Espermatogénicas de Ratón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Roberto Carlos Muñoz Garay

Asesor: Dr. Alberto Darszon Israel

Cuernavaca, Morelos

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

DEDICATORIA

A mi mamá:

Por todo el amor y libertad que me ha dado. Así como por permitirme estar cerca de ella aprendiendo y disfrutando tantos momentos.

A Marlene y Alexia:

Por darme su amor y cariño cada una a su modo y saber despertar en mi este amor que siento por ellas.

A mi abuelo:

Símbolo de amor y unión familiar.

A toda mi familia:

Por contribuir con todo su cariño en mi formación.

A ti, mi estrella.

Que tu brillo nunca este condicionado.

A mis amigos de siempre, por hacerme sentir en familia y permitirme convivir alegrías y tristezas. Gracias por todo su apoyo y comprensión.

APOYOS AL PROYECTO:

El presente trabajo se realizo en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon, en el Departamento de Genetica y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca Morelos.

Durante mi estancia como estudiante de Posgrado, recibí el apoyo de diferentes Instituciones:

Beca para Maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Durante el periodo Febrero de 1995 a Enero de-1997. Con numero de registro 90292.

Beca para Doctorado por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Durante el Periodo de Febrero de 1998 a Enero de 1999.

Beca para Doctorado por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado. Durante el Periodo de Febrero de 1999 a Agosto de 2000.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a mi tutor Dr. Alberto Darszon, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su asesoría pero sobre todo por el apoyo que día a día me manifestó.

A Emma Calderón, Arturo Lievano, Lourival Possani, por saber mostrarme a través de su ejemplo y amistad lo confortable y quimérico que es el desarrollarse en la actividad científica.

A Ricardo Félix, por sus enseñanzas, apoyo incondicional y ayuda durante la fase final de la realización de este trabajo.

Al comité tutorial: Dr Arturo Hernández y Dr. Froylan Gómez, por el seguimiento e interés que le dieron al trabajo, así como por sus contribuciones al mismo.

A los miembros del jurado: Dr. Lourival D. Possani Postay, Dr. Omar Pantoja Ayala, Dra. Alejandra Bravo de la Parra, Dr. Arturo Ponce Balderas, Dr. Ricardo Félix Grijalva, Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. Alberto Darszon Israel, por el tiempo destinado a la corrección de la tesis y sus sugerencias

A todos mis compañeros del laboratorio: Dra. Carmen, Blanca Sr. Juan, Esme, Felipe, Doña Francis, Gise, Jose Luis, Nacho, Daniel, Takuya, Gabriel, Claudia, y Carmen Judith por la tolerancia que me otorgaron y el sin numero de terapias compartidas.

PREFACIO

La reproducción es una estrategia universal usada por todos los seres vivos encaminada, entre otras cosas, a preservar las especies. Desde mucho tiempo atrás, la reproducción sexual se ha estudiado exhaustivamente, en parte por la amplia distribución que tiene entre los organismos vivos y más aún por las enigmáticas ventajas que ofrece. A simple vista, dicha estrategia pareciera carecer de sentido. Es decir, a diferencia de la reproducción asexual ¿porqué arriesgar la formación de un nuevo individuo al encuentro, en ocasiones por mucho fortuito, de los gametos de ambos sexos?; ¿porqué invertir mayor gasto energético en la búsqueda de un gameto homólogo? Cuestiones como estas y otros aspectos de la reproducción sexual la hacen un sujeto interesante de estudio.

En este contexto, el laboratorio donde se realizó el presente trabajo de tesis desde hace tiempo realiza actividades de investigación tendientes a entender con mayor detalle como se lleva acabo a nivel molecular la fecundación entre dos gametos de sexo diferente. Actualmente se tienen caracterizadas estructural y funcionalmente diferentes entidades moleculares presentes en el espermatozoide maduro que pudieran tener un papel crucial en el desarrollo de los eventos fisiológicos que eventualmente culminarán en la fecundación. Así, en el laboratorio se realizan estudios principalmente encaminados a elucidar la naturaleza molecular de los procesos de señalización

intracelular en el espermatozoide una vez que este se activa por la capa externa del óvulo. Para ello, se emplean a los espermatozoides del erizo de mar y del ratón como sistema modelo de experimentación.

El espermatozoide del ratón requiere llevar a cabo dos eventos funcionales secuenciales conocidos como “capacitación” y “reacción acrosomal” (RA) para poder fecundar un óvulo. En estos eventos, entre otros cambios, la permeabilidad a diferentes iones se ve profundamente alterada. Dichos cambios forman parte y modulan a su vez diversas cascadas de señalización intracelular, que gobiernan los procesos moleculares por medio de los cuales se confiere al espermatozoide la capacidad para fecundar al óvulo. Existen varias proteínas transmembranales que pueden regular estos flujos iónicos, entre las que destacan las ATPasas (conocidas también como bombas), los intercambiadores y los canales iónicos. El presente trabajo de tesis se enfoca al estudio de los cambios en los flujos de iones en espermatozoide del ratón como resultado de los procesos fisiológicos mencionados. Profundizar en el estudio del papel que juegan estas proteínas en el espermatozoide sin duda permitirá un mejor entendimiento del mecanismo de regulación de la fecundación y por ende se podrá contar con más y mejores herramientas para analizar más a fondo este proceso en un futuro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Antes de poder fecundar al óvulo, el espermatozoide del mamífero debe completar ciertos procesos de maduración conocidos como capacitación y reacción acrosomal (RA). Durante la capacitación, el potencial de reposo de la célula, es decir, la diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la misma, se vuelve más negativo o hiperpolariza. Por el contrario, durante la RA, es indispensable que ocurra una depolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados. En ambos casos, los cambios en el potencial de membrana están controlados por la apertura y el cierre de canales iónicos presentes en la membrana de la célula. Aunque existen diversas evidencias de la contribución de flujos de K^+ en estos eventos, la presencia de canales de K^+ en estas células no se ha establecido satisfactoriamente desde el punto de vista electrofisiológico. En el presente trabajo, usando la técnica de fijación de voltaje en células espermatogénicas de ratón, se muestran evidencias de la presencia de dos nuevos canales de K^+ que juegan un papel relevante en el establecimiento del potencial de membrana y en los cambios que ocurren durante la capacitación y la RA.

Los resultados muestran la presencia de un canal K^+ , con baja selectividad para el ion K^+ con respecto al Na^+ (5:1), poco sensible al bloqueo por TEA^+ , características que comparte con los canales clonados recientemente conocidos como del tipo *Slo3*. Por otro lado, se caracterizó un canal de K^+ de alta selectividad para este ion y altamente sensible al bloqueo por Ba^{2+} . Dicho canal presenta las características propias de los canales rectificadores entrantes (K_{ir}) además, está sujeto a modulación por cambios en el pH intracelular (pH_i). Los experimentos *in vitro*, con espermatozoides maduros, donde se mide el potencial de membrana, la capacitación y la RA sugieren fuertemente la presencia y participación de este último canal en dichos procesos.

El espermatozoide maduro de ratón tiene un potencial de membrana (E_m) relativamente positivo (~ -56 mV) con respecto a otros tipos celulares. La presencia en estas células de un canal con potencial de inversión en condiciones fisiológicas cercano a -45 mV como el *Slo3* (con baja probabilidad de apertura en el reposo) podría ayudar a explicar el E_m del espermatozoide. Por otro lado, la presencia de un canal altamente selectivo a K^+ como el K_{ir} , que sólo se abre en condiciones particulares (como incrementos de pH_i) podría influir en los cambios del E_m durante la capacitación y/o la RA donde se sabe el pH_i cambia transitoriamente. Este es el primer reporte donde se documenta, mediante registros electrofisiológicos, la presencia tanto de un canal tipo *Slo3* como de un canal K_{ir} en las células espermatogénicas del ratón. Se reportan también los primeros resultados que sugieren su posible relevancia funcional en el espermatozoide maduro.

SUMMARY

To fertilize the egg, the mammalian sperm must complete a maturational process called capacitation and the acrosome reaction (AR). During capacitation, the sperm membrane potential hyperpolarizes, in the other hand, in the AR is essential that a depolarization of the plasmatic membrane happens. In both processes, changes in the membrane potential are controlled by the activity of ionic channels present in the membrane of the sperm. Though exist several evidence of the contribution of K^+ fluxes during these events, possibly due the opening of K^+ channels; nevertheless, there are no electrophysiological evidences about the participation of K^+ channels.

In this work, using patch-clamp recordings obtained from isolated mouse spermatogenic cells, we documented the presence of two K^+ channels that play a relevant role in hold and regulate the sperm membrane potential during these events.

Our results show the presence of a K^+ channel that has a permeability ratio P_{K^+}/P_{Na^+} of 5 and is little sensitive to TEA^+ . These characteristics make it similar to the cloned channel Slo3. In addition, we described a channel with high selectivity to K^+ that is blocked by Ba^{2+} . This channel resembles the characteristics of the inwardly rectifying K^+ channel (K_{ir}), furthermore, is regulated by intracellular pH (pH_i). Experiments in vitro, using mature sperm, measuring the membrane potential, capacitation and AR, suggest the presence and participation of the K_{ir} channel in the AR.

The mouse mature sperm have a relatively positive membrane potential ($E_m \sim -56$ mV), compared with other cellular types. The presence of a K^+ channel with a reversal potential close to -45 mV in physiological conditions (similar to Slo3, which have little open probability in rest conditions), could be setting the resting potential of sperm. In the other hand, the high selective K^+ channel, alike the K_{ir} , that only opens in particular conditions (pH_i increments), could be participating in the E_m changes during the capacitation and/or AR. In both events it is known that there are transiently pH changes.

CONTENIDO

	Pg
DEDICATORIA	ii
APOYOS AL PROYECTO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
PREFACIO	v
RESUMEN	vii
<i>SUMMARY</i>	viii
CONTENIDO	ix
I. INTRODUCCIÓN	12
1) REPRODUCCIÓN	12
A) FECUNDACIÓN	13
Aspectos específicos de la fecundación en mamíferos	14
B) GAMETOS	14
Óvulo	15
Espermatozoide	17
2) ACTIVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE	21
A) MADURACIÓN	21
B) CAPACITACIÓN	22
C) REACCIÓN ACROSOMAL	24
Inductores de la reacción acrosomal	24
3) FLUJOS IÓNICOS DURANTE LA ACTIVACIÓN	26
A) CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} Y pH INTRACELULARES	27
4) CANALES IÓNICOS	29
A) ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD	31
B) FISIOLÓGÍA	33

	Pg
5) CANALES DE K ⁺	33
A) ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE CANALES DE K ⁺	35
B) SELECTIVIDAD	39
C) BLOQUEO	39
6) CANALES DE K ⁺ EN ESPERMATOZOIDE Y CELULAS ESPERMATOGÉNICAS	41
II. OBJETIVOS	46
III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1) OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	47
A) CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	47
B) ESPERMATOZOIDES	48
2) REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	49
A) SOLUCIONES DE REGISTRO	51
3) BIOENSAYOS <i>In vitro</i>	52
A) CAPACITACIÓN	52
B) REACCIÓN ACROSOMAL	52
C) MEDICIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA	53
IV. RESULTADOS	56
1) LOS CANALES TIPO <i>Slo3</i>	56
A) BLOQUEO POR TETRAETILAMONIO Y 4-AMINOPIRIDINAS	62
2) CANALES RECTIFICADORES TARDIOS	62
3) CANALES K _{ir}	66
A) PROPIEDADES FUNDAMENTALES	68
El K _{ext} como determinante de la corriente	68
Rectificación dependiente del E _K	68
Permeabilidad a Rb ⁺ y Na ⁺	73
B) BLOQUEO POR Ba ²⁺ Y Cs ⁺	75
C) MECANISMOS DE RECTIFICACIÓN	81

	Pg
D) MODULACIÓN POR pH INTRACELULAR	83
E) EFECTO DEL Ba ²⁺ SOBRE ESPERMATOZOIDES MADUROS	86
Efecto de Ba ²⁺ durante la capacitación y la reacción acrosomal	86
Efecto de Ba ²⁺ sobre el E _m del espermatozoide	88
V. DISCUSIÓN	92
1) CANAL DEL TIPO <i>Slo3</i>	95
2) EL CANAL K _{ir}	96
3) IMPLICACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS CANALES <i>Slo3</i> Y K _{ir}	98
4) PAPEL FISIOLÓGICO DE LA HIPERPOLARIZACIÓN DURANTE LA CAPACITACIÓN	99
5) SECUENCIA DE EVENTOS DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA RA	101
VI. CONCLUSIONES	104
VII. PERSPECTIVAS	107
VIII. BIBLIOGRAFÍA	108
IX. ANEXOS	117
LISTA DE ABREVIATURAS	117
ANGLISISMOS	119
LISTA DE FIGURAS	119
ARTICULO (Publicado en la revista <i>Developmental Biology</i> 2001)	120

I

INTRODUCCIÓN

1) REPRODUCCIÓN

La evolución ha llevado a una gran variedad de especies a proliferar haciendo uso de la reproducción sexual. Para los organismos, el sexo con frecuencia significa un gasto energético enorme en buscar y cortejar a su pareja. No obstante, una vez formada la célula cigoto los genomas de la hembra y el macho se pueden recombinar entre sí sin mayor dificultad. Los gametos pueden mantener fusiones compatibles (fecundación) mientras se respeten las barreras entre las especies. Por el contrario, la reproducción asexual, una estrategia simple de “copia y división”, a primera vista mostraría menos desorden y más eficiencia. No obstante, la reproducción asexual está lejos de ser el modo mas representado (Hines y Culotta, 1998), lo que ha llevado a diversos investigadores a proponer que el sexo ofrece muchas ventajas evolutivas. Pese a que los biólogos han desarrollado teorías al respecto sobre las ventajas que se ganan, en la actualidad no se tiene una respuesta clara. La mayoría de las teorías sugieren que el sexo y la recombinación eliminan mutaciones perjudiciales y permiten nuevas combinaciones entre los genes generando variabilidad, que da más oportunidad para adaptarse mejor a nuevos ambientes (Wuethrich, 1998).

A) FECUNDACIÓN

La reproducción sexual se da mediante la fecundación, que se define como el proceso de unión de dos células germinales haploides: el óvulo y el espermatozoide. De este modo, cuando ambas células se fusionan el número cromosómico se restaura formando un óvulo fecundado diploide, originando una nueva estructura conocida como cigoto. Entonces se inicia el desarrollo de un nuevo organismo con las características de la especie que le dio origen. En el caso de los mamíferos, si la fecundación falla, tanto el óvulo como el espermatozoide degeneran rápidamente en el tracto reproductivo femenino (Wassarman, 1999; 1999b).

Entre los mamíferos, el proceso de unión de las células germinales incluye algunos pasos ordenados. Esto se da en el oviducto con la unión del espermatozoide a la cubierta externa del óvulo, la *zona pelúcida* (ZP), y finalmente poco tiempo después con la fusión de las membranas plasmáticas del óvulo y el espermatozoide. En este proceso se forma una sola célula "activada", el cigoto. A lo largo del camino, el espermatozoide desarrolla una exocitosis de la vesícula acrosomal que se conoce con el nombre de reacción acrosomal (RA) y penetra a la ZP. Al ocurrir la fusión con el óvulo, este se activa y se dispara la reacción cortical del óvulo, la cual consiste en la liberación de los gránulos corticales por exocitosis modificando de alguna manera la envoltura del huevo durante la fecundación (Wassarman, 1999b).

Aspectos específicos de la fecundación en mamíferos

El paso final de la ovogénesis y espermatogénesis es preparar al óvulo y al espermatozoide, respectivamente, para la fecundación. Durante la ovulación, se completa el crecimiento de los ovocitos en folículos antrales que deben llevar a cabo una “maduración meiótica”, que los transforma en células no fecundadas listas para interactuar con el espermatozoide. De forma similar, una vez depositados dentro del tracto genital femenino, el espermatozoide durante su migración hacia el encuentro con el óvulo lleva a cabo un proceso de “capacitación”, en el cual entre otros cambios hay un rearrreglo de glicoproteínas de membrana, que lo habilita para unirse al óvulo (Visconti y Kopf, 1998; Wassarman, 1999b; Darszon, *et al.*, 1999).

B) GAMETOS

Los gametos son las células germinales maduras que poseen un juego de cromosomas haploides capaces de iniciar la formación de un nuevo individuo por fusión con otro gameto. Estrictamente hablando, el término gameto se aplica sólo antes de la fecundación (Harper, 1994; Wassarman y Albertini, 1994; Eddy y O'Brien, 1994). Al momento de la ovulación, el óvulo ya sufrió la primera división meiótica con la exclusión del primer cuerpo polar y llega al estado de metafase de la segunda división meiótica, donde se detiene hasta que ocurra la activación. Proceso que se inicia cuando, después de penetrar la capa vitelina, el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del óvulo. Los espermatozoides eyaculados son producidos a través de dos

divisiones meióticas que dan origen a cuatro espermatozoides a partir de un espermatocito primario.

Óvulo

En los mamíferos, la ovogénesis se desarrolla tempranamente durante el desarrollo fetal y en el adulto sexualmente maduro. La ovogénesis se inicia con la formación de células germinales primordiales que armónicamente se transforman en ovogonias (de feto), luego en ovocitos y finalmente en óvulos (en el adulto). A través de la vida reproductiva de los mamíferos, los ovarios contienen un número limitado de ovocitos no crecidos y crecidos detenidos en la primera profase meiótica. Sin embargo, sólo los ovocitos crecidos completamente sufren meiosis y son ovulados durante cada ciclo reproductivo (estro). Las gonadotropinas pituitarias controlan el reclutamiento de ovocitos crecidos. El volumen de un ovocito de ratón se incrementa hasta 300 veces en la fase de crecimiento de 2 ó 3 semanas. Este crecimiento del ovocito indica un periodo de intensa actividad metabólica y refleja también cambios marcados en su ultraestructura como el surgimiento de nuevos organelos (gránulos corticales, zona pelúcida) (Wassarman y Albertini, 1994).

Glucoproteínas de la ZP. La membrana plasmática del óvulo en los mamíferos está rodeada por la ZP. La ZP del óvulo de ratón tiene $\sim 6.2 \mu\text{m}$ de espesor y un contenido de $\sim 3.5 \text{ ng}$ de proteína. Esta se compone de tres glucoproteínas, llamadas mZP1 ($\sim 20 \text{ kDa}$; dímero), mZP2 ($\sim 120 \text{ kDa}$) y mZP3 ($\sim 83 \text{ kDa}$) (Bleil y Wassarman 1980), las tres

se encuentran presentes en ovocitos maduros de ratón. Las glucoproteínas mZP2 y mZP3, interactúan entre si mediante uniones no covalentes formando filamentos de 14-15 nm de largo en estructuras repetidas que interconecta mZP1. Cada una de estas glucoproteínas consiste de un polipéptido único que está heterogéneamente glucosilado con uniones de oligosacáridos de los complejos tipo asparagina- (N-) y serina/treonina- (O-) (Wassarman y Albertini, 1994). La eliminación del gene que codifica para mZP3 por recombinación homóloga en células progenitoras de embrión, aparentemente no afecta el fenotipo del ratón macho, sin embargo, produce infertilidad en las hembras (Liu, *et al.*, 1996). Los ovarios de estos animales homocigotos nulos (mZP3^{-/-}) presentan óvulos maduros que carecen completamente de ZP, y los ovocitos de hembras heterocigotos (mZP3^{+/-}) tienen una ZP significativamente disminuida en su grosor (~2.7 μ m) en relación con los controles, sin dejar de ser fértiles. Estos resultados son congruentes con el papel estructural propuesto para la mZP3, y también con el modelo actual de la estructura de ZP (Wassarman, 1999b). Hoy en día, es claro que la ZP del óvulo de una gran variedad de mamíferos, incluyendo los humanos, está compuesta de un pequeño número de glucoproteínas estrechamente relacionadas (~ 40 % - 90 % de homología) con mZP1-mZP3 (Wassarman, 1999b).

mZP3 como receptor del espermatozoide. Diversas evidencias experimentales apoyan la idea de que de las tres glucoproteínas que constituyen la ZP, únicamente la mZP3 se une a la cabeza del espermatozoide con el acrosoma intacto (~ 10⁴ moléculas de mZP3 por cabeza de espermatozoide). Se ha visto también en ensayos de competencia que a

concentraciones nanomolares, mZP3 es un inhibidor eficiente de la unión del espermatozoide a los óvulos no fecundados (Florman y Storey, 1982; Mortillo y Wassarman, 1991).

Espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de gametogénesis en los machos, el cual ocurre en los túbulos seminíferos del testículo. Este proceso implica una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias (células madre), dos divisiones meióticas de los espermatocitos, un abundante remodelamiento morfológico de las células espermáticas durante la espermiogénesis y la liberación de células hacia el lumen de los túbulos seminíferos por espermiación (Hecht, 1995) (ver fig. 1). El espermatozoide de mamífero tiene dos componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola, los cuales se unen en el cuello. La cabeza consiste del acrosoma, el núcleo, un citoesqueleto de estructura reducida y un citoplasma de volumen pequeño. El acrosoma está limitado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas. Este se localiza sobre la parte anterior del núcleo. El núcleo del espermatozoide contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas y el cromosoma está altamente condensado. El flagelo contiene un axonema central rodeado por fibras densas externas que se extienden de la cabeza al extremo posterior. Además, la parte anterior del flagelo contiene una serie de mitocondrias envueltas por unas delgadas hélices que rodean las fibras densas y la parte posterior de la cola consta de una vaina fibrosa rodeando por el exterior a las fibras

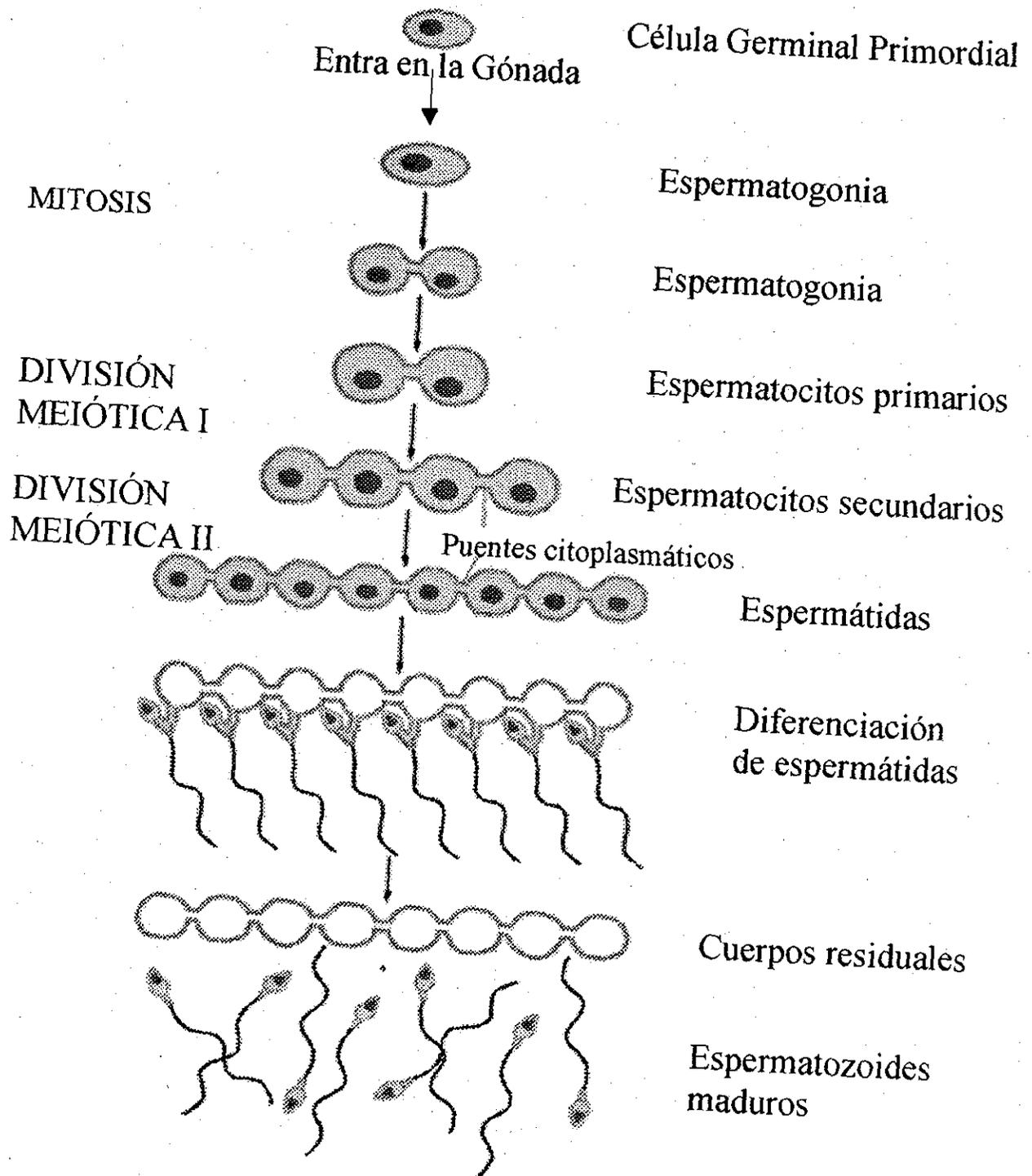


Figura 1. Esquema de la espermatogénesis. Una división mitótica y dos meióticas dan origen a 8 espermatozoides maduros. Durante su maduración puentes citoplasmáticos se forman entre ellos generando sinsicios. Esto brinda un ambiente sincrónico de maduración entre ellos.

densas. El exterior de dichas fibras y la vaina fibrosa forman el citoesqueleto del flagelo (Eddy y O'Brien, 1994) (ver Fig. 2).

Estas características estructurales tan especializadas reflejan capacidades funcionales únicas. Así por ejemplo, las enzimas que contiene el acrosoma son esenciales para la fecundación, y el flagelo contiene la fuente de energía y la maquinaria necesaria para que se de la movilidad. El papel de estos componentes es asegurar que el material genético presente en el núcleo del espermatozoide llegue al óvulo, donde ocurre la combinación de los núcleos masculino y femenino, dando origen al cigoto. En la mayoría de los vertebrados el cromosoma sexual del núcleo haploide del espermatozoide es el responsable de determinar el sexo del producto (Eddy y O'Brien, 1994).

Proteínas del espermatozoide involucradas en la unión al óvulo. Durante los pasados 20 años, casi dos docenas de proteínas diferentes del espermatozoide se han relacionado con la unión del espermatozoide al óvulo (se conocen en su conjunto como EBPs, por sus siglas en inglés "egg-binding proteins"). En algunos casos estas proteínas se han clonado y secuenciado (β -galactosiltransferasa, Lopez y Shur, 1987; proteína -56 del espermatozoide, Bookbinder, *et al.*, 1995; zonadhesina, Gao and Garbers, 1998 y proteína-17 del espermatozoide, Richardson, *et al.*, 1994), e incluso se ha podido determinar la estructura tridimensional de algunas de ellas (espermadhesina, Romero, *et al.*, 1997). De igual manera, en al menos un caso, fue posible inactivar el gene que

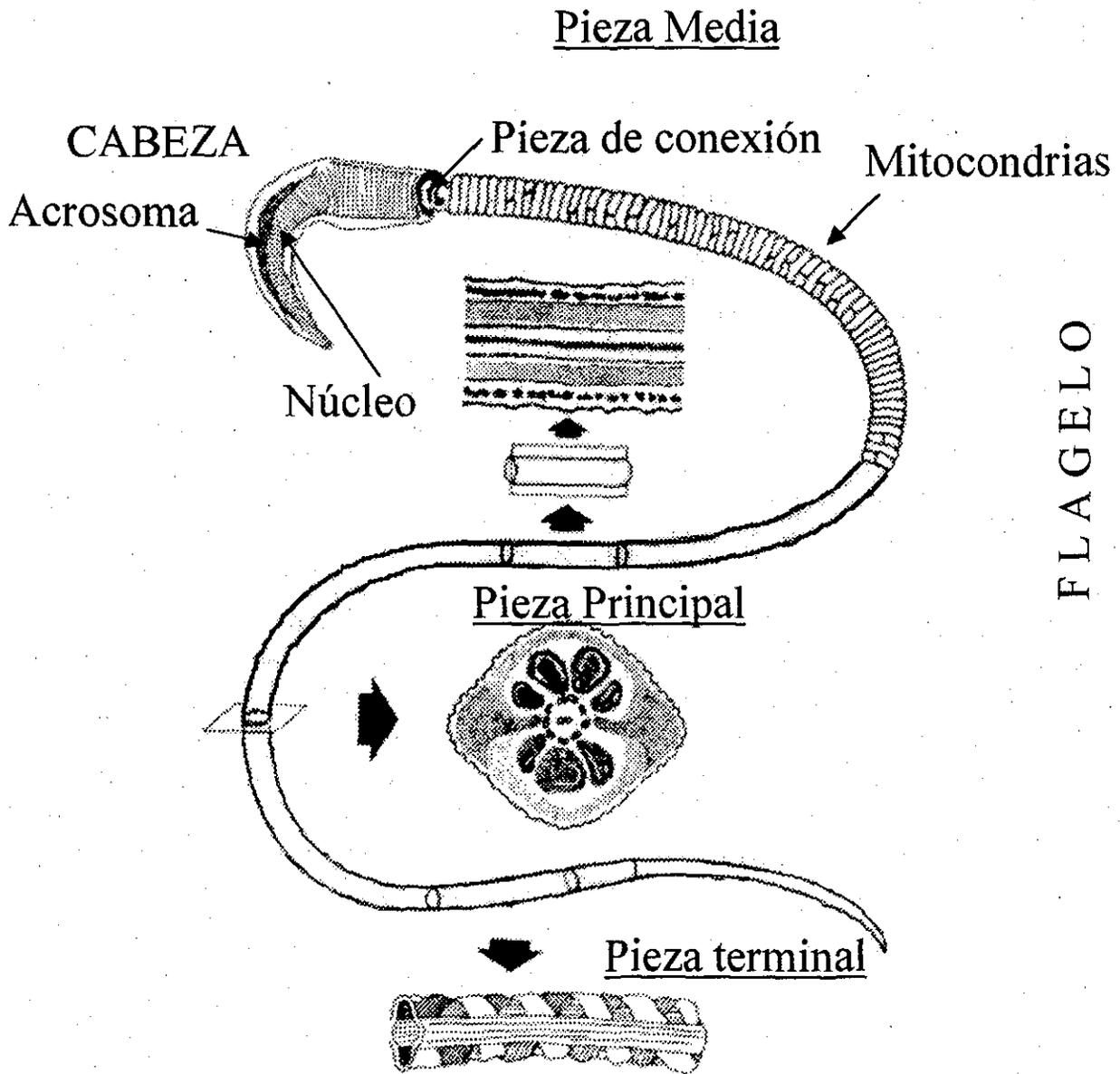


Figura 2. Estructuras generales del espermatozoide de mamífero. La cabeza contiene el núcleo y el acrosoma. La cabeza del espermatozoide está unida a la pieza de conexión del flagelo. Las otras regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza media contiene las mitocondrias y la pieza principal a la vaina fibrosa que envuelve al axonema y las fibras densas externas. Las flechas anchas señalan vistas de cortes longitudinales y transversales de la pieza media y un segmento de la vaina fibrosa.

codifica para las EBPs (β -galactosiltransferasa, Lu and Shur, 1997), y en estos experimentos se pudo ver que el éxito de fecundación se disminuye pero no se abate. A la fecha, ninguna de estas proteínas es considerada como la única responsable del reconocimiento del espermatozoide por el huevo.

2) ACTIVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

A) MADURACIÓN

La maduración del espermatozoide se lleva a cabo en el epidídimo. Uno de los cambios que más se destaca durante la maduración es la aparición de la motilidad, probablemente debido a cambios en la actividad metabólica de la mitocondria. Los espermatozoides testiculares son inmóviles o muy poco móviles. La morfología del núcleo no cambia pero se produce una estabilización de la cromatina debido a la formación de puentes disulfuro. La membrana plasmática del espermatozoide es el sitio en el cual se producen los mayores cambios. Durante su paso por el epidídimo se absorben algunas de las moléculas, generalmente glucoproteínas, también se producen modificaciones en las ya preexistentes y se adicionan nuevas a la membrana plasmática. Asimismo, se producen cambios en la composición lipídica de la membrana, tales como el aumento en el contenido de colesterol. Estos cambios en la composición de la membrana ocurren tanto en la cabeza como en el flagelo (Yanagimachi, 1994).

B) CAPACITACIÓN

La capacitación es un proceso de maduración del espermatozoide no muy bien caracterizado y que se lleva a cabo en el tracto genital femenino. El propósito de este proceso, como su nombre lo indica, es conferir al espermatozoide maduro la capacidad para desarrollar la RA inducida por ZP y fecundar al óvulo. Este proceso probablemente involucra la remoción de factores inhibitorios del espermatozoide acompañada de rearrreglos y/o modificaciones de lípidos y proteínas de la membrana plasmática. Algunas de estas alteraciones resultan en la fosforilación de un conjunto de proteínas en residuos de tirosina que depende de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). También ocurren incrementos en el pH intracelular (pH_i) y la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Visconti, *et al.*, 1995a y 1995b; Zeng, *et al.*, 1996), además de reducirse el contenido de colesterol de la membrana plasmática.

Mediante el uso de colorantes sensibles a los cambios en el potencial de membrana, Zeng y sus cols. (1996) reportaron que durante la capacitación se produce una hiperpolarización en los espermatozoides de toro y de ratón. Esta hiperpolarización no se presenta cuando las células están en un medio no apto para capacitar. Durante la capacitación se produce un aumento de la permeabilidad al K^+ , la cual podría ser responsable al menos de una parte de dicha hiperpolarización (Zeng, *et al.*, 1995). Experimentos *in vitro* revelaron que incrementos en las concentraciones de K^+ externo inhiben la capacitación en espermatozoides de ratón (ver fig. 3). Se ha propuesto que este cambio de voltaje es indispensable para que ocurra la RA (Zeng, *et al.*, 1995;

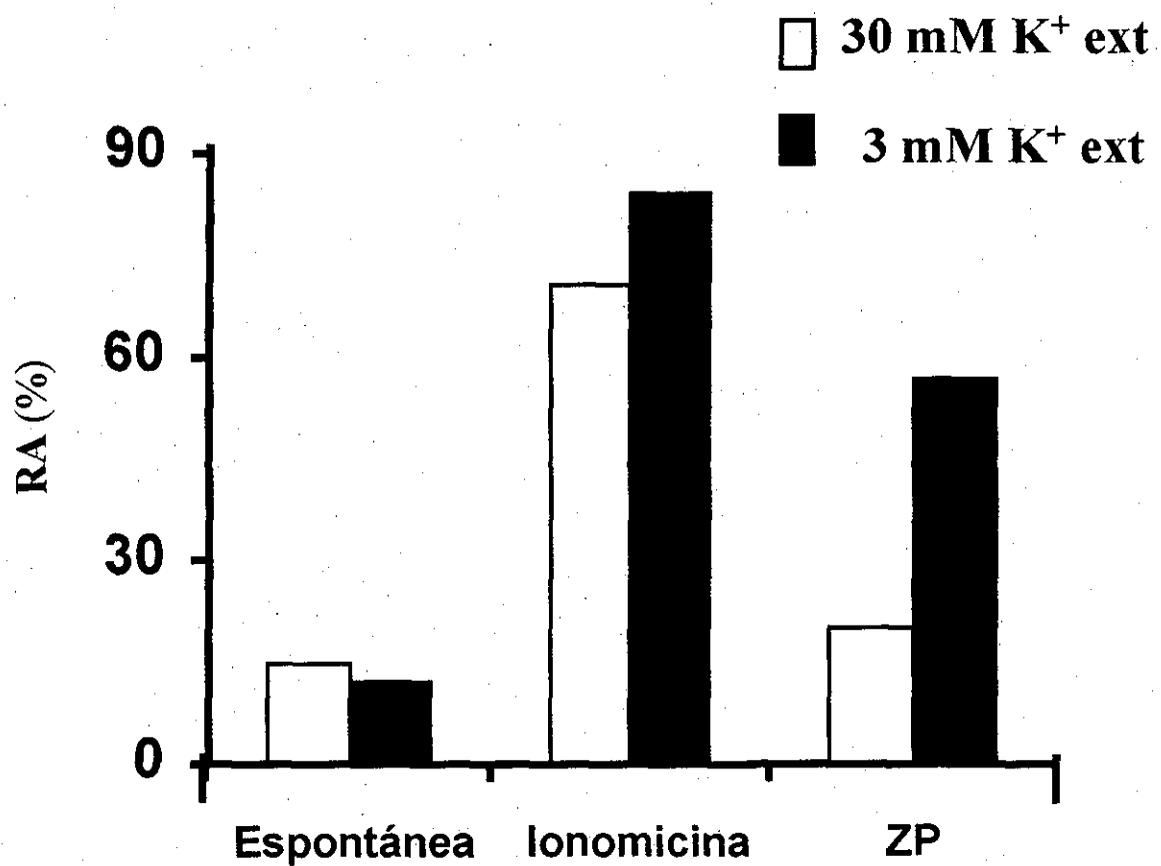


Figura 3. Efecto de K⁺ externo sobre la capacitación de espermatozoides de ratón. La gráfica muestra sobre el eje de las Y el porcentaje de espermatozoides que desarrollan RA como una medida indirecta de la capacitación, bajo diferentes condiciones. Modificado de Arnoult, *et.al.* *Proc. Natl.Acad. Sci.* 96: 6757, (1999).

Arnoult, *et al.*, 1996 y 1999). Así, la maduración meiótica del ovocito y la capacitación del espermatozoide llevan a los gametos ya sea hacia la formación de un cigoto viable o a la degeneración de las células (Fraser, 1995).

C) REACCIÓN ACROSOMAL

La RA es un proceso de exocitosis regulada, que consiste en la liberación del contenido de una gran vesícula secretora que se extiende por encima del núcleo en la región apical de la cabeza del espermatozoide y que se conoce como acrosoma. Con la ayuda de las enzimas líticas liberadas a partir del acrosoma, el espermatozoide puede atravesar las capas externas del óvulo y fecundarlo. Morfológicamente la RA se ve como una fusión entre la membrana acrosomal y la membrana plasmática en la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Dicha fusión resulta en la formación de vesículas híbridas, exposición de la membrana acrosomal y liberación del contenido acrosomal hacia el exterior de la célula (Florman y Storey, 1982 y Fraser, 1995) (ver fig. 4 y 8).

Inductores de la reacción acrosomal

La RA es un proceso regulado por ligandos específicos del óvulo y/o del tracto genital femenino en especies que poseen fecundación interna. Los efectos de estos ligandos están mediados por receptores de superficie y proteínas G (por lo menos en los mamíferos). Pese a que se ha propuesto la existencia de diferentes inductores de la RA actualmente se acepta que ZP3 es el agonista natural que inicia la RA una vez que se une a los espermatozoides con el acrosoma intacto. En experimentos *in vitro* la mZP3

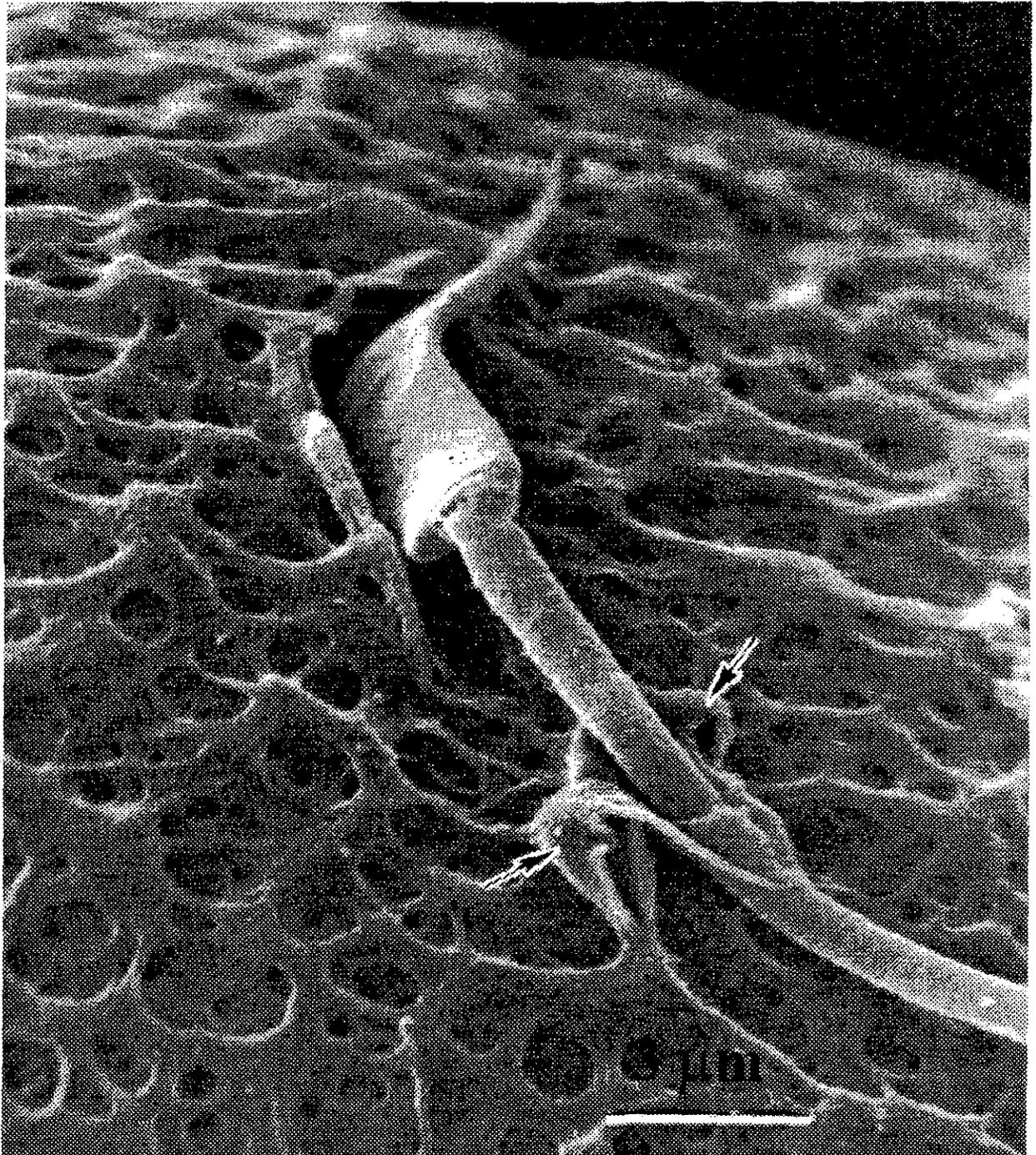


Figura 4. Electromicrografía de barrido de un espermatozoide de hamster entrando en la Zona Pelúcida. Remanentes acrosomales (flechas) se observan rodeando la pieza media del espermatozoide. Tomado de Eddy, EM, The physiology of reproduction, Knobil, E y Neill, R, Eds. Raven Press, New York, 1998, p30.

purificada y glicopeptidos largos de mZP3 inducen RA en espermatozoides, en contra parte, glicopeptidos pequeños de mZP3 y mZP3 unida a oligosacaridos se unen al esperma e inhiben su unión al huevo pero no inducen la RA. Por otro lado, se reporto que entrecruzamiento de glicopeptidos pequeños de mZP3 unidos al esperma pueden inducir en él la RA. Datos como los anteriores permiten proponer que la inducción de la RA por la ZP3 puede ser dependiente de interacciones multivalentes (Darszon, *et al.*, 1996; Vacquier, 1998; Wassarman 1999a).

3) FLUJOS IÓNICOS DURANTE LA ACTIVACIÓN

Como otras células, los espermatozoides pueden mantener gradientes iónicos a través de su membrana plasmática. Así, la concentración de K^+ en el interior del espermatozoide es alta en comparación con el exterior donde la concentración de Na^+ es la elevada. Este gradiente se mantiene gracias a la actividad de una K^+/Na^+ ATPasa. De acuerdo con Babcock (1983), las concentraciones intracelulares de K^+ y Na^+ en espermatozoides (del epididímo caudal) de bovino son aproximadamente 120 y 14 mM, respectivamente.

Las concentraciones iónicas en el interior y exterior de la célula se mantienen constantes hasta antes de la capacitación durante la cual el K^+ tiende a disminuir y el Na^+ a incrementarse en el interior celular. Además, durante las primeras dos horas de

capacitación ocurre un incremento en la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ (Yanagimachi, 1994). Las concentraciones extracelulares de estos iones cambian en el trayecto del espermatozoide hacia el epidídimo y el tracto genital femenino.

A) CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} Y EL pH INTRACELULARES

Al igual que la exocitosis en células somáticas, se necesitan incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para iniciar la RA. Una elevación progresiva en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observa cuando el espermatozoide pasa de no capacitado (50-100 nM) a capacitado (125-175nM) incrementándose aun más cuando se da la RA inducida por ZP3 (300-500nM) (Florman, *et al.*, 1998). Asimismo, los espermatozoides estimulados muestran una elevación transitoria del pH_i , de ~6.5 a ~6.8, durante la capacitación (Zeng, *et al.*, 1996). Por su parte, durante la RA se pueden alcanzar valores de pH_i hasta de 7.0 (Florman y First, 1988; Florman, *et al.*, 1992 y Fraser 1993). Cambios de pH_i de esta magnitud pueden ser suficientes para afectar las concentraciones de inositol-3,4,5-trifosfato (IP_3) y la unión a sus receptores y producir por lo tanto, la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Arnoult, *et al.*, 1996; Florman, *et al.*, 1998). Se ha propuesto que un intercambiador aniónico ($\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) y/o alguna vía de transporte aún no caracterizada son los responsables del incremento del pH_i (Zeng, *et al.*, 1996; Garcia y Meizel, 1999). Dado que incrementos de AMPc se relacionan con incrementos de pH_i , se cree que la alcalinización del espermatozoide en respuesta a la ZP3 puede activar una adenilato ciclasa (AC) dependiente de Ca^{2+} /calmodulina,

fosfatasas y cinasas, así como tirosinas cinasas y varias fosfolipasas (Darszon, *et al.*, 1996; Florman, *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente en células espermatogénicas, al igual que en espermatozoides maduros de ratón, se ha caracterizado una AC soluble que es estructural, molecular y bioquímicamente distinta a la AC transmembranal que responde a hormonas. Esta AC soluble, no presenta dominios transmembranales y es insensible a los moduladores clásicos de las AC transmembranales como las proteínas G y los ligandos del sitio P. La AC soluble se estimula directamente por iones de bicarbonato (Sinclair, *et al.*, 2000 y Chen, *et al.*, 2000).

Los incrementos de Ca^{2+} observados durante la RA (Florman, *et al.*, 1998) se han estudiado extensivamente en sistemas *in vitro*. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que se da durante la RA se bloquea mediante el empleo de diferentes fármacos cuyo blanco de acción son canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Fraser, *et al.*, 1989; 1993; Florman, *et al.*, 1992; Espinosa, *et al.*, 1999). Por otro lado, mediante estrategias de biología molecular se ha identificado la presencia de ARNm y proteínas de diferentes subunidades $\alpha 1$ de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Serrano, *et al.*, 1999 Goodwin, *et al.*, 2000). Estos trabajos y otros, han demostrado la existencia de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en células espermatogénicas y espermatozoides (Santi, *et al.*, 1996 ; Espinoza, *et al.*, 2000).

Actualmente se acepta que la estimulación del espermatozoide por la ZP3 activa canales de Ca^{2+} tipo T operados por el voltaje transmembranal. La unión a ZP3 provoca una

depolarización de la membrana del espermatozoide de $\sim 60\text{mV}$ a $\sim 30\text{mV}$, rango de voltaje en el que activan los canales de Ca^{2+} tipo T. De este modo, la depolarización podría influir en la apertura de canales de Ca^{2+} y así en el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ requerida en la RA (fig. 5). Por otro lado, se ha propuesto que después de la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T en el espermatozoide, se da una liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, quizá a través de una vía que involucra al IP_3 y a sus receptores (Darszon, *et al.*, 1999; Florman, *et al.*, 1998). Como consecuencia de lo anterior, durante los minutos siguientes a la inducción de la RA se mantiene una entrada sostenida de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} , del tipo modulado por el vaciamiento de las reservas intracelulares de Ca^{2+} (SOC, de sus siglas en inglés “stock operating channels”) (Santi, *et al.*, 1998; O'Ttoole, *et al.*, 2000).

4) CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas importantes en el funcionamiento celular. Ellos se localizan en la membrana plasmática y en algunas membranas intracelulares, permitiendo el paso de ciertos iones de un lado a otro de la membrana. La técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (“patch clamp”) ha permitido medir la actividad de canales individuales o en conjunto. Asimismo, la tecnología del ADN recombinante está contribuyendo grandemente a revelar detalles sobre la gran diversidad genética de estas proteínas. Recientemente, los estudios de cristalografía y de transferencia de energía, han dado lugar a descripciones finas de la estructura de estos

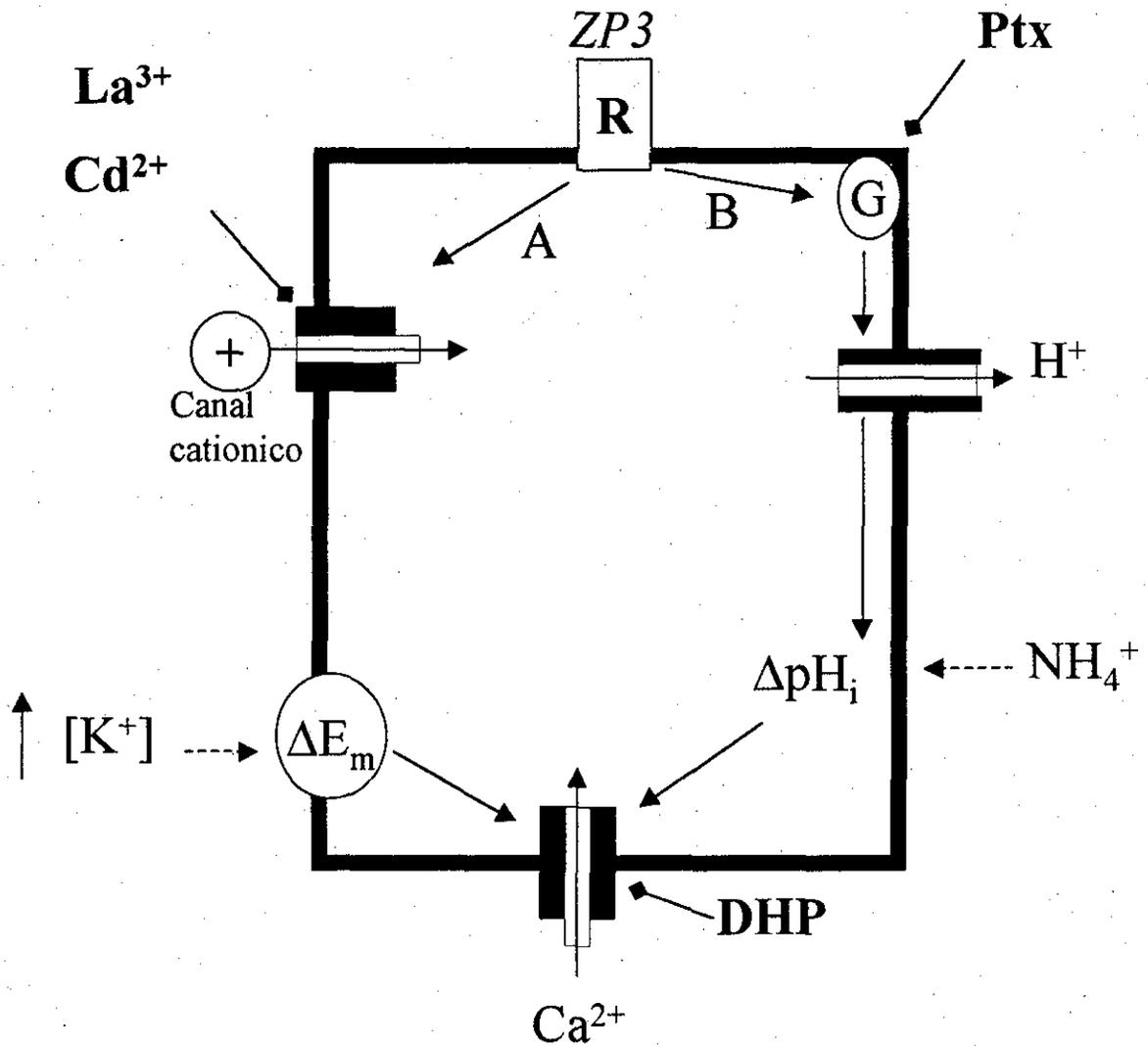


Figura 5. Modelo de la traducción de la señal inducida por la ZP3 en el espermatozoide del mamífero. La unión de ZP3 al receptor del espermatozoide (R) inicia una señal bifurcada. A) Por un lado, se activa un canal catiónico a través de un mecanismo sensible a Cd^{2+} , La^{3+} , Ptx y dihidropiridinas (DHP), determinando una entrada de cationes y una depolarización de la membrana (ΔE_m). Esta vía de activación puede reproducirse depolarizando con alto K^+ externo (flecha punteada). B) Una vía sensible a Pertusistoxina (Ptx), produciendo alcalinización intracelular. Esta alcalinización puede inducirse experimentalmente con NH_4Cl (flecha punteada). Los efectos de Ptx indican la participación de proteínas G_i en este proceso. Estas dos vías si actúan de modo concertado, podrían regular la actividad de los canales de Ca^{2+} , permitiendo la entrada de este ion y el inicio de la RA. La figura indica los sitios en los cuales la transducción de la señal se puede bloquear (flechas con extremo en forma de rombo) (Modificado de Arnoult y cols., 1996).

canales (Doyle, *et al.*, 1998; Glauner, *et al.*, 1999). A través del uso de estas herramientas experimentales hemos podido entender mejor algunas de las propiedades generales de estas proteínas. Entre ellas se encuentran su alta selectividad, en la mayoría de los casos para permitir el flujo sólo de ciertos iones, su importante contribución en la determinación del potencial de membrana (E_m), su susceptibilidad al bloqueo por compuestos orgánicos cargados y/o toxinas, así como la dependencia al voltaje y los mecanismos de apertura y cierre del canal. (Hille, 1992; Aidley y Stanfield 1996).

A) ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD

Actualmente se conocen mucho más tipos de canales iónicos de los que originalmente se había pensado que existían (Wei, *et al.*, 1996, Coetzee, *et al.*, 1999). Esta amplia diversidad genera problemas para su clasificación y nomenclatura, por lo cual, es indispensable revisar cada vez con mayor frecuencia los reportes actuales acerca de las relaciones entre los diferentes canales.

Los canales iónicos se describen comúnmente en función de su selectividad iónica y los mecanismos que los abren y los cierran. Por ejemplo, todas las células excitables presentan canales cuya apertura y cierre se regula por cambios en el voltaje transmembranal, de los cuales existen tres tipos principales: el primer grupo incluye a los canales de K^+ , canales de Na^+ , canales de Ca^{2+} y canales de Cl^- (Catterall, 1988; Hille, 1992). Otro grupo de canales consiste de aquellos que se activan directamente por mensajeros químicos extracelulares como los neurotransmisores. Estos incluyen, entre

muchos otros, al receptor de acetilcolina, a los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA) y al receptor de glicina. Un tercer grupo incluye a todos los canales modulados por ligandos intracelulares, tales como el Ca^{2+} , el ATP y los nucleótidos cíclicos. En ocasiones estos dos últimos grupos se combinan para agruparlos en una sola clase (canales regulados por ligando o activados químicamente) para diferenciarlos de los activados por el voltaje (Hille, 1992).

Con la ayuda de la biología molecular, se ha obtenido un número creciente de secuencias genómicas y se ha podido establecer relaciones filogenéticas entre los grupos de canales en función de sus secuencias (Wei, *et al.*, 1996). No obstante, no todas las secuencias de aminoácidos de los canales están relacionadas. Los canales modulados por neurotransmisores, por ejemplo, están bastante alejados de los canales dependientes de voltaje, y muestran poca o ninguna similitud en secuencia y estructura. Sin embargo, los miembros de este grupo, entre los que destacan los canales activados por acetilcolina, glicina, GABA y 5-hidroxitriptamina están claramente relacionados entre sí. No obstante, existen excepciones como por ejemplo, los receptores a glutamato que son bastante diferentes del resto de canales activados por ligandos (Aidley y Stanfield 1996). La superfamilia de proteínas ABC (que contienen un dominio de unión al ATP) también forman un grupo distinto, y algunos tienen actividad de canales iónicos (Seino, 1999).

B) FISIOLÓGÍA

Los canales iónicos participan de manera directa en procesos celulares como la percepción sensorial (Fesenko, *et al.*, 1985), la exocitosis (Almers 1990), la contracción muscular (Weiss y Magleby, 1992), la conducción del impulso nervioso (Brady, 1991), la quimiotaxis (Babcock, *et al.*, 1992; Cook, *et al.*, 1994), la fecundación (Darszon, *et al.*, 1996, 1999) y otros muchos eventos de la fisiología celular. La electrofisiología con el apoyo de otras disciplinas estudia las proteínas que forman estos canales iónicos, con la finalidad de entender el papel que desempeñan en los diferentes tipos y estadios celulares. Al principio de la caracterización de esas proteínas, la atención se centró en entender como los canales iónicos determinan las propiedades eléctricas de la membrana celular. Hoy en día, sin embargo, el interés en ellas se extiende mas allá del estudio biofísico y electrofisiológico. Estas proteínas se ha visto son elementos fundamentales dentro de ciertas vías de señalización durante procesos como la activación y proliferación celular. También se han identificado como moléculas responsables de patologías congénitas o adquiridas. como el caso de desordenes neuronales y motores (Banatar, 2000).

5) CANALES DE K⁺

Los canales de K⁺ son proteínas de membrana que están presentes tanto en las células excitables (neuronas, fibras musculares esqueléticas y cardiacas, etc.) como en las que

no son típicamente consideradas excitables (células epiteliales, espermatozoides, etc.). Estos canales juegan un papel fundamental en procesos celulares tan variados como la excitabilidad celular, la liberación de neurotransmisores, la secreción hormonal, la regulación del volumen celular o la integración neural.

De acuerdo con varios autores (Wei, *et al.*, 1996; Coetzee, *et al.*, 1999), se pueden diferenciar seis familias principales de canales de K^+ , estructuralmente relacionados (subunidad α con 6 segmentos transmembranales): 1) Los canales de K^+ dependientes de voltaje, que incluye a los canales *shaker* y Kv1-4, 2 y 3) los canales de K^+ de alta y baja conductancia activados por Ca^{2+} (*Slo* y SK, respectivamente), 4) los canales de K^+ activados por nucleótidos cíclicos por el lado intracelular y que son asociados a neuronas sensoriales (CNG), 5) Canales de K^+ relacionados con canales caracterizados en músculo cardiaco, relacionados con el síndrome QT largo, una disfunción cardiaca hereditaria (KQT) y 6) Son canales de K^+ relacionados también con el síndrome QT largo en corazón, pero que tienen propiedades de apertura y cierre del canal dependientes del voltaje muy distintas a los clásicos canales dependientes de voltaje, incluye a los canales *herg* y *elk*, (Eag). Un séptimo grupo estructuralmente distinto a los anteriores (subunidad α con 2 segmentos transmembranales), Es el de los canales de K^+ rectificadores entrantes (K_{ir}). Esta ultima familia incluye a los canales GIRK (canales modulados por proteínas G), así como a los dependientes y sensibles a ATP.

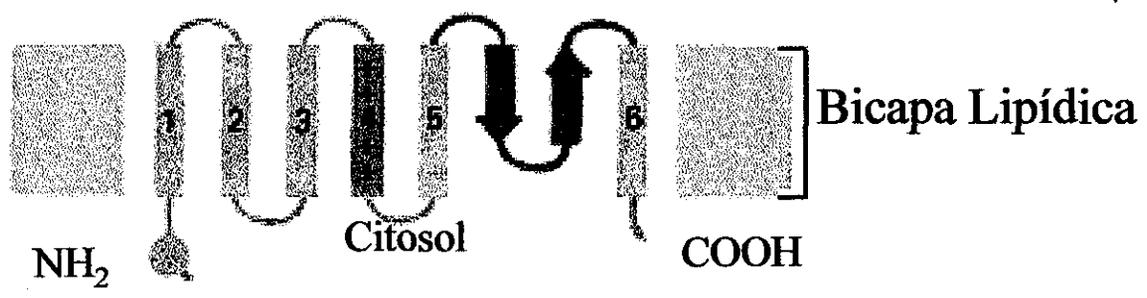
A) ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE CANALES DE K⁺

La Clase estructural de canales de K⁺ de 6 segmentos transmembranales constituye el grupo mas grande de canales conocido al momento. Amplios estudios sobre su estructura y oligomerización para constituir al canal funcional se han realizado por distintos grupos. Los miembros de esta Clase consisten de una subunidad α altamente conservada en los dominios hidrofóbicos y regiones amino y carboxilo terminales citoplasmáticas. La región central de cada subunidad α está formada por seis dominios transmembranales (S1-S6) y un segmento H5 entre S5 y S6, que juntos constituyen el poro del canal. El segmento S4, contiene un número considerable de residuos de aminoácidos cargados positivamente, por lo cual se le ha involucrado en la regulación de la apertura y cierre del canal, actuando como un sensor de voltaje. Los dominios que participan en la inactivación se localizan en el amino terminal, el poro y el segmento S6 (Cha, *et al.*, 1999; Glauner, *et al.*, 1999). La figura 6 muestra un modelo de la estructura molecular de estas proteínas. Los canales de K⁺ de la Familia *Slo*, poseen en el carboxilo terminal un dominio de unión al ion Ca²⁺, por medio del cual este ion regula el mecanismo de apertura y cierre del canal. En los canales del tipo CNG, la secuencia del carboxilo terminal contiene un sitio posible de unión a nucleótidos cíclicos (Rudy, 1988; Tempel, *et al.*, 1988; Stuhmer, *et al.*, 1989; Brown, 1993; Salkoff, *et al.*, 1992; Dolly y Parcej, 1996).

La segunda Clase estructural de la Superfamilia de canales de K⁺ incluye a los rectificadores entrantes de 2 segmentos transmembranales y de la cual solo hay una

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



B

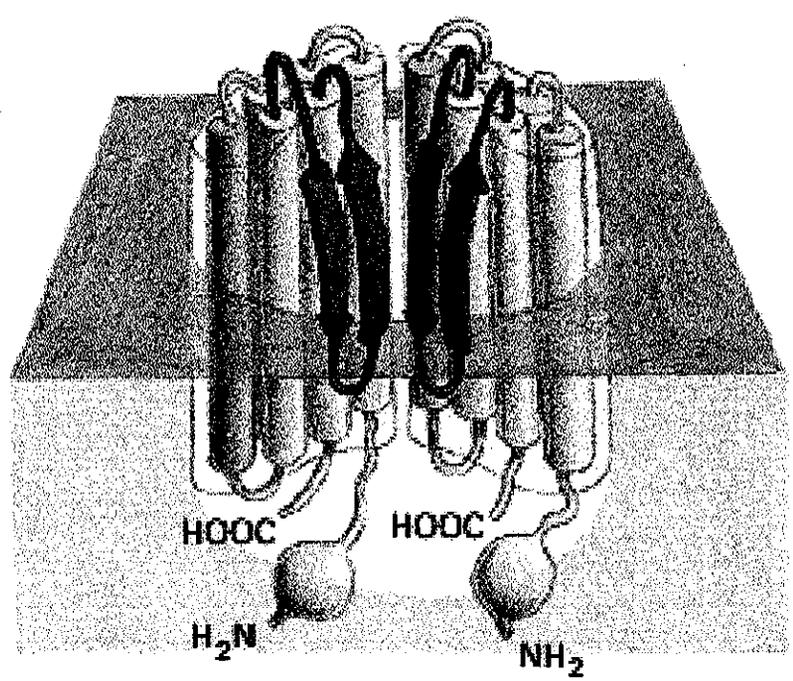


Figura 6. Modelo de la estructura de los canales de K^+ de 6 segmentos transmembranales modulados por voltaje. A) Diagrama topológico que muestra el dominio funcional mayor de la cadena polipeptídica de una subunidad α , con seis probables hélices α transmembranales, enumeradas del 1 al 6. Cuatro de estas subunidades, cada una con aproximadamente 600 aa, se ensamblan para formar un poro transmembranal. B) Esquema de la organización estructural de un canal de K^+ en donde solo se muestran 2 subunidades α . El segmento de 20 aa (mostrado en rojo), presente en la región que une el segmento 5 y 6, generalmente se extiende a cruzar la membrana como dos cadenas antiparalelas β a la línea del poro como se muestra. La cuarta hélice α (azul) presenta residuos cargados positivamente en cada tercera posición, de esto se deduce que la hélice funciona como un sensor de voltaje de la membrana. En algunos canales de K^+ , el dominio amino-terminal está involucrado en la inactivación rápida del canal, mediante un mecanismo de “bola y cadena”.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Familia representada por 7 Subfamilias. Entre ellas se encuentran canales de K^+ que pueden ser regulados por proteínas G, sensibles a ATP, dependientes de ATP, regulados por voltaje y modulados por pH. La subunidad α de estos canales está formada por dos segmentos hidrofóbicos M1 y M2 y una región que los une entre si (H5), homólogos a los segmentos S5, S6 y el H5 de los canales de K^+ del tipo *shaker*, respectivamente.

Así, los canales rectificadores entrantes y los del tipo *Shaker* poseen el mismo diseño básico de la región del poro y se sabe que los miembros de ambas Subfamilias se ensamblan a manera de tetrámeros (Christie, *et al.*, 1990; Isacoff, *et al.*, 1990; Ruppertsberg, *et al.*, 1990). No obstante, a diferencia de los canales de K^+ sensibles al voltaje (*Shaker*), el flujo de K^+ a través de los canales rectificadores entrantes hacia el exterior de la célula esta limitado por el bloqueo interno del canal por una partícula ajena (Mg^{2+} o poliaminas), originando una conductancia diferencial entre ambos lados del potencial de equilibrio de K^+ (E_K). Por otro lado, se sabe que los canales de K^+ sensibles al ATP están asociados con los receptores de sulfonilurea, una superfamilia de proteínas que presentan un dominio de unión al ATP (Krapivinsky, *et al.*, 1995; Nichols y Lopatin, 1997; Choe, *et al.*, 1999; Lu, *et al.*, 1999; Seino, 1999; Minor, *et al.*, 1999).

Los canales rectificadores entrantes pueden permitir el paso de la corriente hacia el exterior y en realidad esa podría ser su función principal en la célula. En condiciones fisiológicas, el E_m de la célula difícilmente llega a ser más negativo que el E_K . Debido a que dichos canales conducen corriente saliente en el intervalo de voltaje cercano a E_K ,

ellos mantienen el potencial de reposo de la célula cercano al E_K , pero una vez que otras fuerzas depolarizantes influyen en la célula, el E_m puede cambiar. El intervalo en el cual estos canales estabilizan el E_m depende de las vías que regulan la apertura y cierre de los canales (Hille, 1992; Weessel, *et al.*, 1999).

Otra Clase estructural de canales de K^+ es la de dos poros. Esta engloba una serie de proteínas recientemente clonadas por homología a partir de una base de datos de ADN, entre las que destacan los canales del tipo TOK1, CEK y TWIK. Estos canales presentan en realidad una nueva arquitectura molecular. La característica que los hace únicos es la presencia en serie de dos secuencias que forman el poro. La estequiometría propuesta para este tipo de canales debería ser de dímero, en virtud de que se requiere la presencia de cuatro dominios de poro para formar un canal funcional selectivo al ion K^+ . Interesantemente, la estructura de los canales de doble poro favorece el eflujo de K^+ a voltajes menos negativos que el E_K (Medhurst, *et al.*, 2001; Loukin y Saimi, 1999).

La familia de la subunidad IsK (MinK) está compuesta por un sólo representante. Se trata de un polipéptido corto de un sólo dominio transmembranal que induce una activación muy lenta de corriente de K^+ cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus* (Suessbrich, *et al.*, 1999; Yang, *et al.*, 1998).

B) SELECTIVIDAD

Los estudios de la permeabilidad a las diferentes especies iónicas con respecto al K^+ ponen de manifiesto propiedades similares entre ellos. La mayoría de estos canales además de conducir K^+ son permeables a cuatro cationes diferentes: Tl^+ , K^+ , Rb^+ y NH_4^+ (Hille 1992). No obstante, la permeabilidad a dichos cationes puede ser ordenes de magnitud menores que para K^+ . De este modo, patrones de selectividad pueden establecerse entre estos iones para un determinado canal ver tabla 1. (Hille 1992; Aidley y Stanfield, 1996; Doyle, *et al.*, 1998).

TABLA 1. Relación de permeabilidad ionica, P_x/P_K , para algunos canales de K^+

ION	RECTIFICADOR TARDIO			RECTIFICADOR	TRANSIENTE	BK
	nodo de rana	músculo de rana	neurona de caracol	ENTRANTE	TIPO A	K(Ca)
K^+	1	1	1	huevo de Estrella de mar	Neurona Caracol	músculo de rata
Rb^+	0.91	0.95	0.74	1	1	1
Cs^+	<0.077	<0.11	0.18	0.35	<0.14	<0.05
Li^+	<0.018	<0.02	0.09	----	<0.07	<0.02
Na^+	<0.010	<0.03	0.07	<0.03	<0.09	<0.01

Modificado de Bertil Hille. Ionic channels of excitable membranes. University of Washington. Snauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts. 1992, 352.

C) BLOQUEO

El empleo de agentes bloqueadores ha sido de gran ayuda en el esclarecimiento de los mecanismos biofísicos que controlan la actividad de los canales de K^+ , así como de las implicaciones fisiológicas de estos canales en las distintas células en que se presentan.

El agente bloqueador mejor conocido de los canales de K^+ es el ion Tetraetilamonio (TEA^+) (Stanfield, 1983). Además, otros compuestos como los derivados de amonio cuaternario son también eficaces bloqueadores de los canales de K^+ . Los experimentos clásicos de Armstrong (1971, 1974), utilizando el compuesto trietilamonio (C_9), han resultado particularmente valiosos para entender los mecanismos de bloqueo del canal. De estos trabajos, quedó claro que el bloqueo por C_9 en la parte interna del canal se da sólo una vez que el canal se encuentra abierto. Resultados similares se obtienen con TEA^+ que constituye uno de los bloqueadores más ampliamente utilizados. Las aminopiridinas, especialmente la 4-amino piridina (4-AP), se unen específicamente a algunos canales de K^+ dependientes de voltaje (Dolly y Parcej, 1996).

Además de los compuestos inorgánicos, también se cuenta con toxinas de naturaleza peptídica de origen natural que bloquean los canales de K^+ en el rango de concentraciones nanomolares (MacKinnon y Miller, 1988; Dolly y Parcej, 1996; Possani, *et al.*, 2000). En los últimos años se han descubierto en el veneno de varios animales un número importante de péptidos que bloquean canales de K^+ . Estas incluyen a la apamina en el veneno de las abejas, a la caribdotoxina (CTX) y a la noxiustoxina (NTX) en el veneno de los alacranes y a la dendrotoxina (DTX) en la vívora mamba (Castle, *et al.*, 1989, Gurrola, *et al.*, 1995; Garcia, *et al.*, 1997; Possani, *et al.*, 1999). La CTX y la NTX son péptidos pequeños del veneno de los alacranes *Leiurus quinquestriatus* y *Centruroides noxius*, respectivamente. El primero, bloquea con mayor afinidad a canales de K^+ activados por Ca^{2+} mientras que la NTX tiene mayor afinidad

sobre canales de K^+ modulados por voltaje (ver tabla 2). Ambas toxinas pueden unirse cuando el canal está abierto o cerrado. La afinidad de estas toxinas por los canales de K^+ no es la misma para todos los canales, por ejemplo, CTX tiene una K_d de 3 nM para $Kv1.3$ pero por arriba de 1 μM para el $Kv1.1$ y $Kv3.1$ (Carbone, *et al.*, 1982; Grissmer, *et al.*, 1994; Drakopoulou, *et al.*, 1995).

TABLA 2. Agentes bloqueadores de canales de K^+

CANAL DE K^+	BLOQUEADOR
Rectificador Tardío	TEA ⁺ , Cs ⁺ , H ⁺ , Ba ²⁺ , Capsaicina, Dendrotoxina, Noxiustoxina.
Tipo A	TEA ⁺ , Dendrotoxina
K(Ca)	TEA ⁺ , Cs ⁺ , Apamina, Caribdotoxina
K _{ir}	TEA ⁺ , Cs ⁺ , Rb ⁺ , Na ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺
K(ATP)	TEA ⁺ , Cs ⁺ , Ba ²⁺

Modificado de Bertil Hille. Ionic channels of excitable membranes. University of Washington. Snauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts. 1992, 131.

6) CANALES DE K^+ EN EL ESPERMATOZOIDE Y EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

Como se mencionó al inicio, tanto el erizo de mar como el ratón se han usado como modelos para el estudio de la fisiología del espermatozoide. Las evidencias de la

presencia de canales de K^+ en espermatozoides y su posible contribución en la fisiología de estas células se obtuvieron inicialmente en el erizo de mar.

La primer respuesta observada sobre el potencial de membrana en espermatozoides del erizo *Lytechinus pictus* expuestos a la gelatina del huevo (inductor fisiológico de RA, en erizo de mar) es una hiperpolarización transitoria, después de la cual se depolariza la célula. Esta hiperpolarización se inhibe cuando el K^+ externo se incrementa de 10 a 30 ó 40 mM (González-Martínez y Darszon, 1987). Un canal altamente selectivo a K^+ se caracterizó en estas células y se consideró responsable de dicha hiperpolarización (Babcock, *et al.*, 1992). También se ha registrado la actividad de canales de K^+ en bicapas formadas en la punta de un microcapilar utilizando vesículas de membranas de flagelo de espermatozoide. Se identificaron tres tipos de canales de K^+ con conductancias de 22, 46 y 88 pS. Dos de ellos se bloquean con TEA^+ , que inhibe la RA en el erizo (Lievano, *et al.*, 1985). Dado las observaciones anteriores, durante los últimos años se han estudiado los mecanismos por los cuales estas células pueden regular los flujos de K^+ durante la RA, y por lo tanto, la fecundación. Se han reportado otros canales de K^+ en *S. purpuratus*. Un canal de K^+ sensible a monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) se caracterizó mediante el uso de vesículas de membrana de espermatozoide y técnicas de fluorescencia (Galindo, *et al.*, 2000). Por otro lado, en bicapas planas formadas a partir de vesículas de la membrana plasmática de flagelo, se registró un canal catiónico selectivo preferentemente a K^+ . En este trabajo se estableció una relación de permeabilidad K^+/Na^+ de ~ 5 . Este canal es sensible a AMPc pero no a

GMPc y concentraciones micromolares de Ba^{2+} en trans lo bloquean (Labarca, *et al.*, 1996). Posteriormente a partir de erizo de mar dicho canal se clonó y se documentó que este es el encargado de regular las corrientes activadas por hiperpolarización conocidas como I_h (corrientes hiperpolarizantes), caracterizadas ampliamente en células cardíacas (Gauss, *et al.*, 1998).

Por otro lado, en el caso de espermatozoides de mamífero existen evidencias de cambios en el flujo de K^+ durante la fecundación (Zeng, *et al.*, 1995; Arnoult, *et al.*, 1996 y 1999). Sin embargo, poco se conoce acerca de los canales iónicos en estas células. En su trabajo pionero, Hagiwara y Kawa (1984) mencionaron la existencia de una corriente de K^+ dependiente de voltaje en las células espermatogénicas de la rata, cuya amplitud disminuye conforme las células maduran y pasan del estado de espermatogonia al de espermatozocito. Dicha corriente es susceptible al bloqueo por tetraetilamonio TEA^+ y mostró ser independiente de Ca^{2+} externo (Hagiwara and Kawa, 1984).

Tiempo después, Kaupp y sus colaboradores (1994) reportaron la clonación (a partir de testículo de bovino) y expresión funcional de un canal catiónico modulado por nucleótidos cíclicos. Este canal se registró en vesículas de membrana de cabeza del espermatozoide y directamente en membranas de espermatozoide de humano mediante la técnica de registro en microáreas de membrana (*patch-clamp*) en su configuración *inside-out*. Este canal pertenece a la familia de canales catiónicos modulados por

nucleótidos cíclicos previamente descritos en células fotorreceptoras y neuronas olfatorias (Weyand, *et al.*, 1994). En un tercer trabajo se reportó la presencia de canales aniónicos y catiónicos mediante el uso de bicapas lipídicas artificiales, vía fusión, a partir de preparaciones de membranas de espermatozoide de rata y humano. La corriente de K^+ se bloqueó con 0.1 mM de TEA^+ y la conductancia unitaria que se midió fue de 24 pS (Chan, *et al.*, 1997). En espermatozoides de ratón mediante la técnica de fijación de voltaje en bicapas planas, se caracterizaron tres distintos tipos de canales iónicos. Un canal de Ca^{2+} , un aniónico, y un catiónico, éste último con una relación de permeabilidad P_K/P_{Na} igual a 2.5 (Labarca, *et al.*, 1995).

Recientemente, Salkoff y sus colaboradores (1998) reportaron la clonación de un canal de K^+ a partir de un banco de ADNc de testículo de ratón. Este canal llamado *Slo3*, a diferencia de los otros miembros de la familia (*Slo*, modulados por Ca^{2+}), se modula por pH_i y voltaje, tiene una selectividad para K^+ (apenas 5 veces mayor que para Na^+), y se bloquea por altas concentraciones de TEA^+ ($IC_{50} \sim 50mM$) (Schreiber, *et al.*, 1998). Por último, Pessia y sus colaboradores (1999) identificaron la expresión de ARNm para la subunidad α K_{ir} 5.1 de canales de K^+ rectificadores entrantes, de testículo de rata. Además, usando un anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular de K_{ir} 5.1, identificaron su expresión en células espermatogénicas y espermatozoides maduros. Utilizando sistemas de expresión heteróloga, como el de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, se observó que el K_{ir} 5.1 es incapaz de dar origen a canales funcionales. Esto sólo se logra mediante la coexpresión de la subunidad α del K_{ir} 5.1 con la del K_{ir}

4.1, lo cual permite tener canales funcionales constituidos como heterotetrameros (Salvatore, *et al.*, 1999).

Como puede observarse, el campo de los canales de K^+ en las células espermatogénicas y el espermatozoide maduro permanece poco explorado. De hecho, sólo en el trabajo de Hagiwara y Kawa (1984) se registraron corrientes directamente de las células espermatogénicas. Asimismo, no se tiene evidencia detallada de la participación de alguno de estos canales en la fisiología del espermatozoide. No obstante, tal y como lo veremos más adelante, muy probablemente algunos de ellos juegan un papel crucial en la fisiología del espermatozoide. Demostrar esto, fue parte de los objetivos del presente trabajo.

II

OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar los canales de K^+ presentes en células espermatozógenas de ratón y establecer su posible implicación fisiológica.

PARTICULARES

1.- Optimizar el método de aislamiento de células espermatozógenas de ratón que permita mejorar las condiciones de registros electrofisiológicos en estas células.

2.- Identificar y caracterizar funcionalmente los canales de K^+ presentes en células espermatozógenas de ratón.

2.1.- Diseñar una estrategia experimental que permita diseccionar las distintas corrientes de K^+ en las células espermatozógenas.

2.2.- Caracterizar electrofisiológicamente a los canales de K^+ responsables de las corrientes registradas en células espermatozógenas.

2.3.- Caracterizar farmacológicamente los canales de K^+ presentes en células espermatozógenas.

3.- Establecer mediante estrategias experimentales *in vitro*, el papel fisiológico de los canales de K^+ en el espermatozoide.

3.1.- Conocer la contribución relativa de los canales de K^+ en el establecimiento del potencial de membrana del espermatozoide.

3.2.- Investigar su papel en el proceso de capacitación.

3.3.- Investigar su función en la reacción acrosomal.

III

MATERIALES Y MÉTODOS

1) OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

A) CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

Mediante escisión quirúrgica se obtuvieron los testículos de ratones adultos de la cepa CD-1 sacrificados por dislocación cervical, y se colocaron en un medio de disociación frío, que contenía en mM: 130 NaCl; 3 KCl; 2 MgCl₂; 0.5 NaH₂PO₄; 5 HEPES; 10 Glucosa; pH 7.4, suplementado con DNAasa I (75 U/ml). Después de la remoción de la *tunica albuginea*, los túbulos seminíferos se separaron entre sí, mediante el uso de tijeras y pinzas de punta fina, bajo el microscopio estereoscópico. A partir de ellos, se procedió a la obtención de células (espermatogénicas y simplastos [fusión de un sincitio, formando una célula polinucleada]) mediante dispersión mecánica, al hacer pasar los túbulos a través de una pipeta Pasteur. Las células se incubaron con DNAasa I (75 U/ml) y tripsina (0.2 mg/ml) durante 5 minutos a 37 °C en agitación suave y constante, y se recuperaron posteriormente por centrifugación (4 minutos a 2500 rpm). Después de dos lavados con la solución de disociación, la pastilla celular se resuspendió en el medio de registro electrofisiológico y las células se mantuvieron en hielo hasta antes de usarse. En estas condiciones las células se mantuvieron viables al menos 8 h. La suspensión celular así obtenida consistió en realidad de una población heterogénea

de dos estadios mayoritarios: espermatocitos en paquiteno y espermatidas redondas. Estas células se usaron rutinariamente en los registros electrofisiológicos. Con este propósito, alícuotas de 20 μ l de la suspensión celular se depositaron en una cámara de registro que tenía un volumen final de 250 μ l. La cámara se colocó posteriormente sobre la platina de un microscopio invertido y se procedió a realizar los registros electrofisiológicos tal y como se detalla mas adelante.

B) ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides maduros del epidídimo caudal de ratones CD-1 se recolectaron mecánicamente puncionando el epidídimo expuesto quirúrgicamente y se depositaron en tubos para microcentrifuga de polypropileno de 1.5 ml que contenían 700 μ l de medio 199 (Sigma Chemical Co., St Louis) suplementado con BSA (0.4 % peso/volumen), piruvato de sodio (30 mg/l) y NaHCO_3 (4.2 g/l) a 37 °C. Después de 5-10 min se determinó el nivel de movilidad por inspección visual y las preparaciones de células con <75 % de movilidad se descartaron.

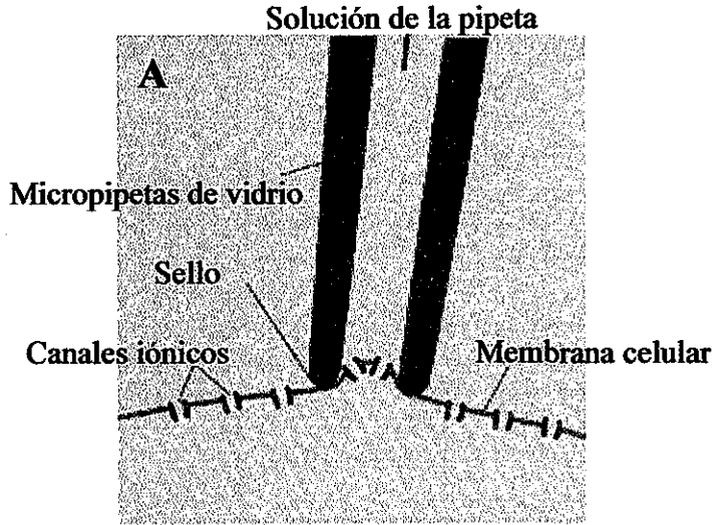
Para llevar a cabo la capacitación *in vitro* de los espermatozoides extraídos de esta forma, se emplearon en alícuotas de 300-400 μ l de una suspensión celular ($4-5 \times 10^6$ células/ml), en medio 199 suplementado, y se incubaron a 37 °C durante 30 min, para que se desarrollara la capacitación. Los espermatozoides se colectaron y usaron en los ensayos de RA *in vitro*.

2) REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

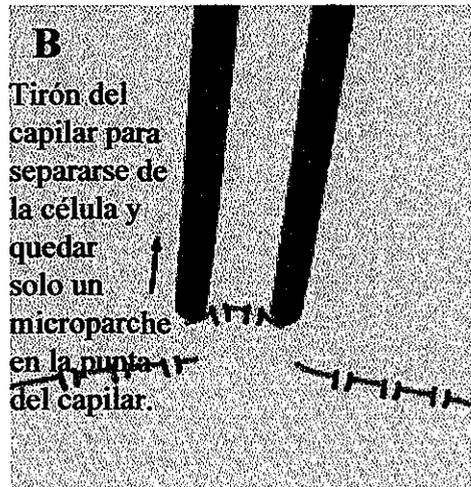
Las corrientes de K^+ se registraron de acuerdo a la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración de célula completa (*whole-cell patch clamp*) (Hamill, *et al.*, 1981) (fig. 7). Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente mediante el uso de un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), y micropipetas de registro fabricadas a partir de tubos capilares de vidrio de borosilicato en un estirador horizontal (Sutter Instrument Co., Novato, CA). Cuando estaban llenas de la solución de registro, dichas micropipetas presentaron una resistencia de 2-4 M Ω . El potencial de mantenimiento de las células (HP, de sus siglas en inglés "Holding Potential") y los protocolos de estimulación se fijaron de acuerdo con el tipo de canales que se quería registrar. Por ejemplo, para los canales *Slo3*, el potencial de mantenimiento que se utilizó fue de -90 mV y los pulsos depolarizantes (de -80 a 80 mV con incrementos de 10 mV) de 300 ms de duración. Para el caso de los canales K_{ir} el potencial de mantenimiento fue de 0 mV y los pulsos tanto hiperpolarizantes como depolarizantes se aplicaron en pasos de 10 mV (-120 a 50 mV) a una frecuencia de 0.5 Hz. El diseño y la aplicación de los protocolos de pulsos, así como el almacenamiento y análisis de los datos se realizaron usando el programa pCLAMP versión 6.0.4 (Axon Instruments). Los registros de las corrientes se capturaron en línea a 5-10 kHz y se filtraron a 2-5 kHz, utilizando una computadora conectada a una interfase DigiData 1200 (Axon Instruments). La corriente de fuga se restó del registro utilizando clampfit (pCLAMP, Axon Instruments).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SOBRE LA CELULA "ON CELL"



EL INTERIOR VIENDO HACIA FUERA "INSIDE OUT"



CELULA COMPLETA "WHOLE CELL"

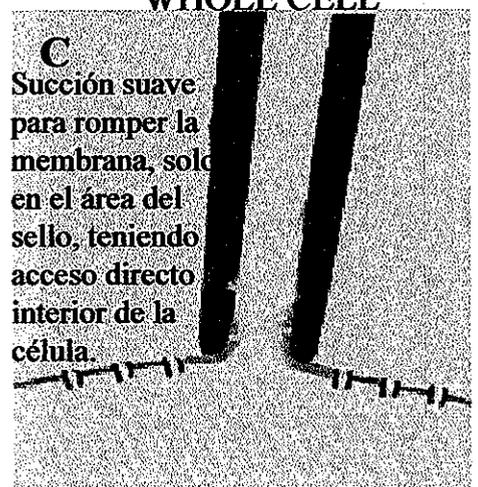


Figura 7. Configuraciones de sellos de membrana utilizados en la fijación de voltaje. Los registros de corriente a través de canales de una microárea de membrana puede registrarse aún cuando el sello se mantenga unido a la célula, como en A, o desprendido de ella como en B. Otra opción es no desprender la pipeta una vez que se ha sellado y hacer presión negativa suave a la pipeta para propiciar que se rompa la membrana dentro del diámetro de la boca del capilar y tener de este modo acceso al interior celular, como en C.

A) SOLUCIONES DE REGISTRO

Para registrar las corrientes de K^+ , se emplearon diferentes soluciones en función del objetivo de cada experimento. En la tabla 3 se presenta una lista de diferentes soluciones, a las cuales nos referiremos al describir los registros que se presentan en los resultados de este trabajo.

TABLA 3: COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES DE REGISTRO

Soluciones del baño

SB	K-SO ₃	*NMDG ⁺	Na-SO ₃	RbOH	NaOH	KOH	KOOCH ₃	pH
I	150	---	---	---	---	---	---	7.4
II	2	---	126	---	---	---	---	7.4
III	2	126	---	---	---	---	---	7.4
IV	128	---	---	---	---	---	---	7.4
V	30	98	---	---	---	---	---	7.4
VI	60	68	---	---	---	---	---	7.4
VII	---	68	---	---	---	60	---	7.4
VIII	---	68	---	---	60	---	---	7.4
IX	---	68	---	60	---	---	---	7.4
X	75	---	---	---	---	---	75	8.1
XI	75	---	---	---	---	---	75	6.3
XII	150	---	---	---	---	---	---	6.3

Todas las soluciones contenían (en mM): 6.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 3.3 Glucosa.

*NMDG⁺ = N-Methyl-D-Glucamina

Soluciones de la pipeta

SP	MgCl ₂	Hepes	EGTA	EDTA	K-SO ₃	KCl	pH
I	1	10	5	---	122	8	7.35
II	---	10	---	5	120	10	7.35
III	1	5	5	---	122	8	7.35

Todas las soluciones contenían (en mM): 20 KF, 2.5 CaCl₂.

3) BIOENSAYOS *In Vitro*

A) CAPACITACIÓN

Los espermatozoides maduros se resuspendieron (a una densidad de $1-5 \times 10^6$ células/ml) en 800 μ l de medio comercial 199. Para inducir capacitación el medio se suplemento con BSA (0.4 % peso/vol), piruvato de sodio (30 mg/l), NaHCO₃ (4.2 g/l) y se mantuvieron a 37 °C durante 30 min. El índice de espermatozoides capacitados se midió indirectamente por su capacidad para responder a la ZP, midiendo RA. En los experimentos de inhibición por Ba²⁺ se agregó 1 mM del catión divalente al medio capacitante desde el inicio de la incubación.

B) REACCIÓN ACROSOMAL

Después de capacitar, se tomaron 40 μ l de espermatozoides y se colocaron en tubos Eppendorf que contenían el equivalente en g a 5 ZP/ μ l suficientes para inducir RA. En

los experimentos de inhibición se añadió 1 mM de Ba^{2+} 5 s antes de añadir el ligando y la RA se indujo mediante una incubación de 30 min a 37 °C. Una vez inducida la RA, las células se fijaron por 10 min con formaldehído al 10 %. Posteriormente se bañaron durante 5 min en 22 % de azul de Coomassie G-250, 50 % metanol y 10 % ácido acético glacial. Por último los espermatozoides se lavaron con PBS y se montaron en laminillas. Los espermatozoides que presentaron RA, se pudieron distinguir por el típico color azul que les confiere la tinción una vez que han excitado el acrosoma (fig. 8).

C) MEDICIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

Los espermatozoides capacitados y sin capacitar se resuspendieron (2×10^6 células/ml) en un tubo de registro al que se le agregó 3,3'-dipropiltiodicarbocianina, yoduro ($DiSC_3(5)$), Molecular probes, Eugene, OR) a una concentración final de 1 μ M. La fluorescencia se midió con un fluorómetro Hansatech MkII (Norfolk, UK) a una longitud de onda de 620/670 nm excitación/emisión. En estas condiciones experimentales, la hiperpolarización de la membrana disminuye la intensidad de la fluorescencia. El registro se inició después de eliminar el potencial de membrana de la mitocondria con 100 nM del desacoplante carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP; Sigma Chemical Co., St Louis). Los niveles de fluorescencia del estado estacionario de la señal se convirtieron entonces a valores de E_m . Para ello, primero se midió la fluorescencia cambiando las concentraciones de K^+ extracelular mediante adiciones de KCl (1.25 a 10 mM, concentración final) en la presencia de 650 nM de

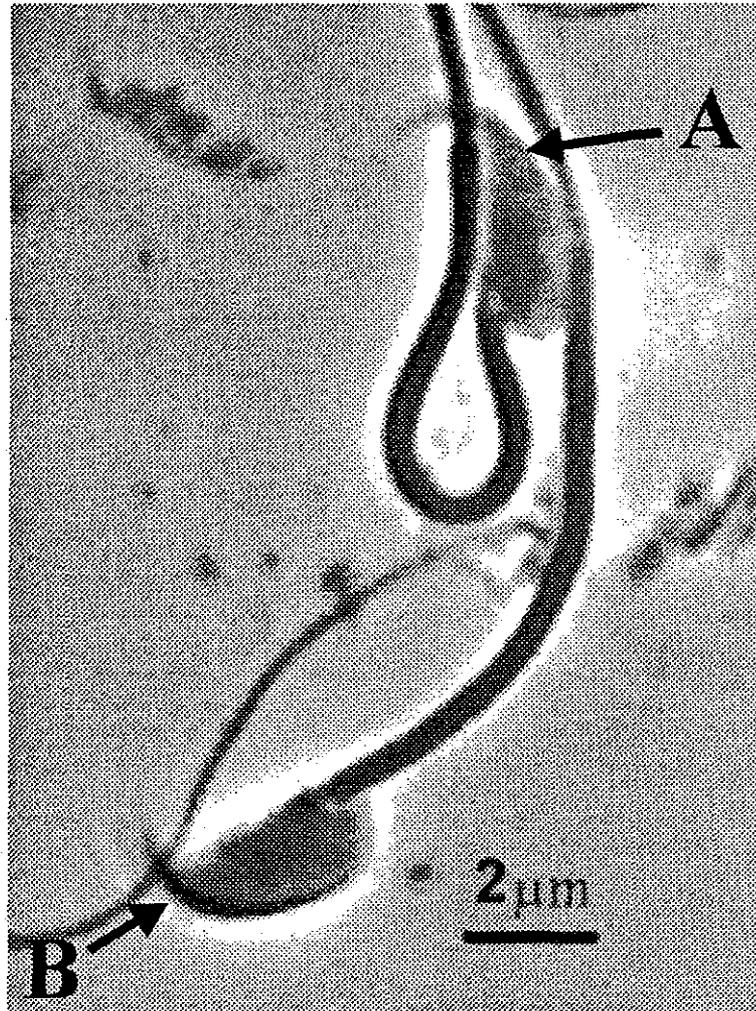


Figura 8. Tinción diferencial con azul de Coomassie en espermatozoides reaccionados y no reaccionados. Fotografía digitalizada de una imagen en microscopía de contraste de fases. La flecha **A** muestra la región que corresponde a la posición del acrosoma en un espermatozoide no reaccionado; Flecha **B** indica la región del acrosoma teñido en un espermatozoide que presentó RA.

valinomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis). Posteriormente el E_m se calculó de acuerdo a la ecuación de Nernst (Hille, 1992), asumiendo una concentración intracelular de K^+ de 120 mM y que la membrana es un electrodo para K^+ bajo la presencia de valinomicina, un ionóforo selectivo para K^+ . El E_m en espermatozoides capacitados en presencia de Ba^{2+} también se estimó mediante esta técnica.

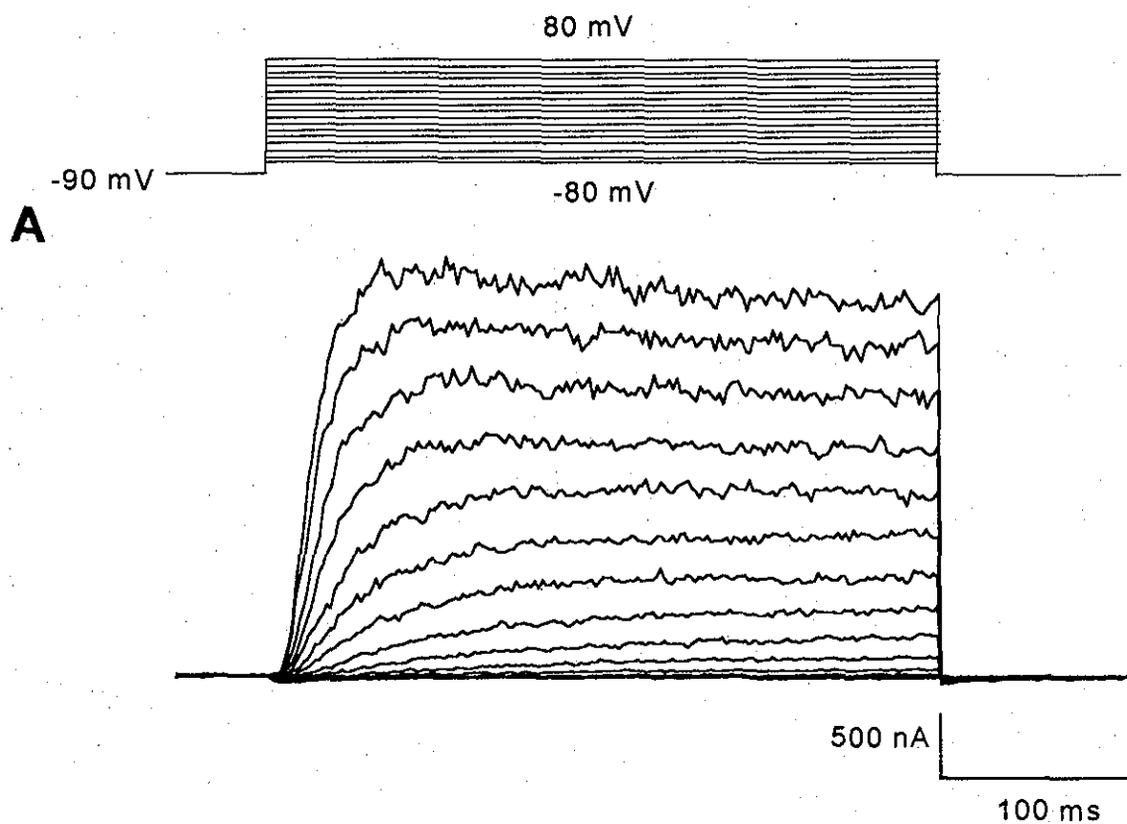
IV

RESULTADOS

Los canales de K^+ presentes en las células espermatozógenicas de ratón se caracterizaron mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (fig. 7C). Mediante esta técnica se logró registrar y caracterizar parcialmente dos tipos de corrientes salientes atribuidas al ion K^+ . En adelante nos referiremos a estas corrientes como la corriente del tipo *Slo3* y la corriente saliente sensible a TEA^+ (previamente reportada por Hagiwara y Kawa, 1984). Una breve descripción de estas corrientes se presenta a continuación.

1) LOS CANALES TIPO *Slo3*

En el presente trabajo se reporta la existencia de un canal de K^+ rectificador tardío en células espermatozógenicas. La caracterización del canal se documentó con una serie de experimentos de fijación de voltaje en la configuración de célula completa. Las soluciones usadas fueron: solución interna con 150 mM de K^+ y una solución externa con 2 mM de K^+ (tabla 3 SPI y SBII). Un ejemplo de la corriente registrada se presenta en la figura 9, donde se muestra una familia de corrientes a diferentes voltajes, de rápida



B

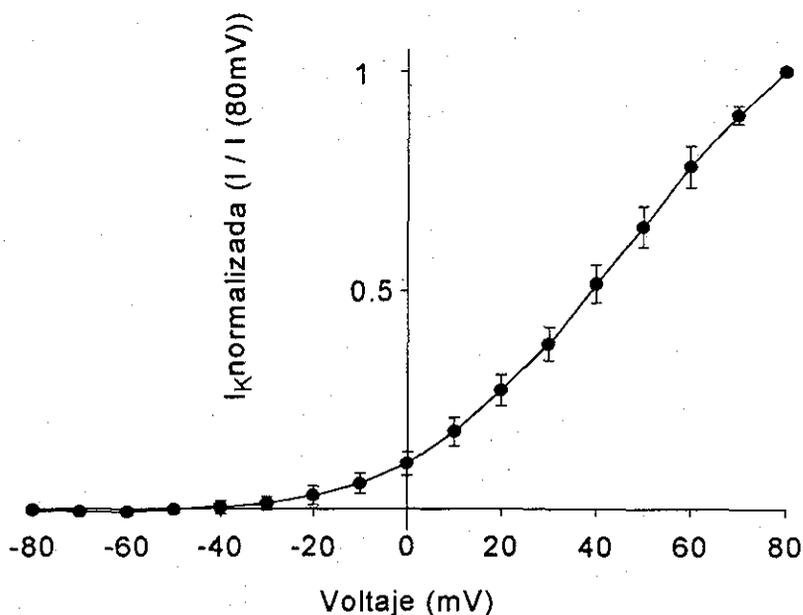


Figura 9. Corriente de célula completa, tipo *Slo3*. A) Registros de corriente obtenidos de células espermatogénicas, el protocolo de voltaje se esquematiza en la parte superior de los trazos. B) Curva I-V, la corriente se normalizó respecto a la amplitud de la corriente en estado estacionario al voltaje de 80 mV. Los puntos son el promedio de 5 experimentos independientes, con su respectiva \pm DE.

activación ($\tau_{act}=8.6$ ms a 60 mV) y no inactivante durante los pulsos y tiempos probados (-80 a 80 mV y 300 ms). La corriente de la célula es de mayor magnitud conforme se incrementan los pulsos en el sentido depolarizante (fig. 9A). En estos registros se utilizaron soluciones bajas en Cl^- , con la idea de evitar la contaminación de corrientes de Cl^- previamente reportadas en estas células (Espinosa, *et al.*, 1999). La figura 9B muestra una gráfica de la amplitud de la corriente con respecto al voltaje, en estado estacionario, de los canales tipo *Slo3*. En esta gráfica se puede apreciar que el canal se empieza a activar a voltajes por arriba de -40 mV. Cabe mencionar que de 283 simplastos estudiados solo en el 15% de la población se logró registrar ésta corriente.

Como una evidencia de que la corriente saliente que se registró era dependiente de K^+ , una misma célula se registró usando una solución externa control que contenía 2 mM de K^+ y en una que contenía 30 mM de K^+ . En estas soluciones se disminuyó al ion mayoritario metanosulfonato de Na^+ en la misma concentración para no afectar su osmolaridad. En estos experimentos se pudo apreciar que la amplitud de la corriente disminuyó con respecto al control, como era de esperarse debido a la disminución de la fuerza impulsora al incrementarse la concentración externa de K^+ (fig. 10).

Una forma de determinar cuál es el ion que se está moviendo a través de un canal es trabajar con "protocolos de colas" durante los registros electrofisiológicos. Estos protocolos cambian la fuerza impulsora súbitamente (por cambios de voltaje) mientras el canal se encuentra abierto. Esta manipulación permite ver a que voltaje la corriente

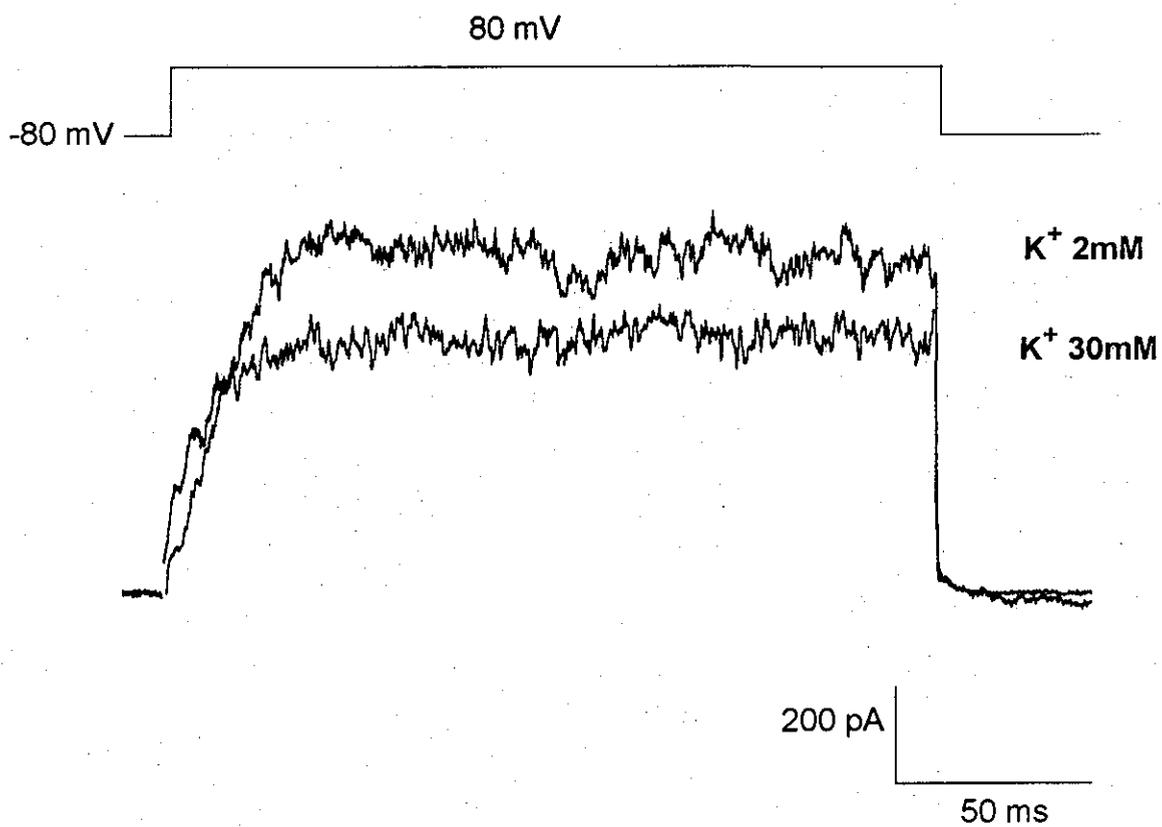


Figura 10. Efecto del K⁺ externo sobre la corriente del tipo *Slo3*. Registros de célula completa en presencia de 2 y 30 mM de K⁺ externo como se indica, el protocolo de voltaje se esquematiza en la parte superior del trazo.

invierte (E_{rev} , donde el flujo neto de iones es cero). Con este valor experimental de E_{rev} y sabiendo las concentraciones iónicas de las soluciones (interna y externa), se puede saber mediante la ecuación de Nernst si la corriente que se registra es atribuible a un solo ion. Si la corriente es el producto del flujo de más de un tipo de ion, entonces con la ecuación general del E_{rev} de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) se puede saber la relación de permeabilidad entre los iones que se mueven a través del canal. Así, en la figura 11A se muestra una familia de corrientes obtenidas de un simplasto mediante un protocolo de colas, el cual se muestra en la parte superior de la figura. De este tipo de registros se partió para hacer las curvas corriente voltaje, tomando la amplitud de la corriente al tiempo cero del cambio de voltaje. El valor se obtuvo ajustando una ecuación exponencial de segundo orden al trazo de la corriente, sin considerar datos al tiempo en el que existe una contribución importante de la corriente capacitiva, y tomando el valor que se obtiene de la función al tiempo cero.

La figura 11B muestra la curva I-V de la corriente al tiempo cero en el intervalo de voltaje de interés, y de ella se infiere que el E_{rev} es cercano a -46 mV. Este valor está alejado del E_K (-96 mV), por lo que se puede concluir que el canal no es del todo selectivo para el ion K^+ . El otro ion que podría moverse a través del canal en nuestras condiciones experimentales sería el Na^+ , sin embargo, el valor del E_{Na} (122 mV) teórico obtenido se aleja también mucho de E_{rev} experimental. Por esta razón y considerando que los iones mayoritarios presentes en nuestras soluciones son Na^+ y K^+ se tomaron las concentraciones de estos para establecer la relación de permeabilidad entre ellos,

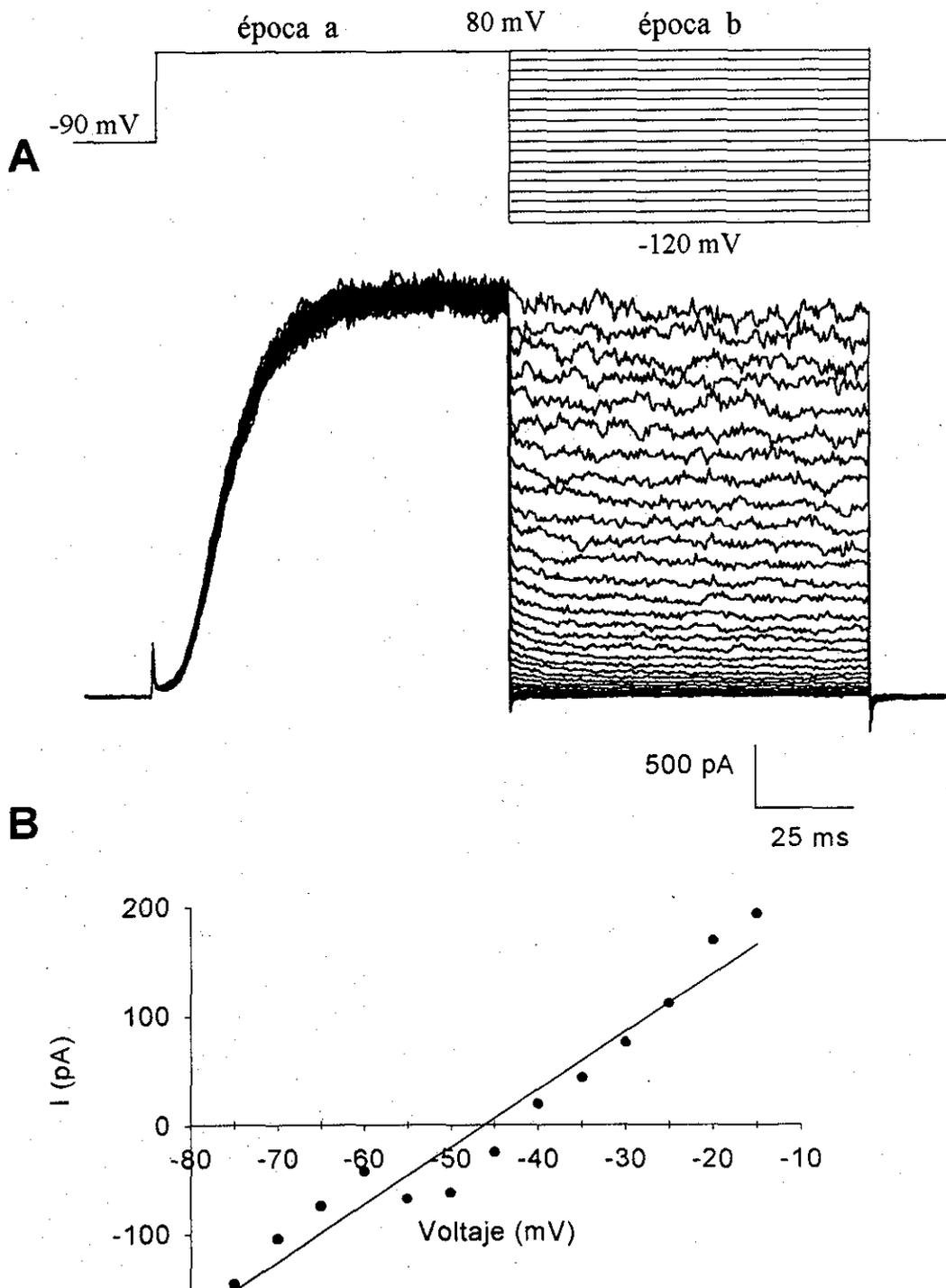


Figura 11. Protocolo de colas y potencial de inversión de la corriente del tipo *Sl03*. Corriente de célula completa evocada a 80 mV por 90 ms, voltaje en el que se tiene una fracción importante de canales abiertos, posteriormente se cambia el voltaje súbitamente a distintos valores lo cual cambia la fuerza electromotriz que mueve al ion responsable de la corriente, el protocolo se esquematiza en la parte superior del trazo. B) Curva I-V, la amplitud de la corriente se tomo al inicio del episodio "b". La línea se ajustó a una recta de la cual se puede estimar el E_{inv} .

utilizando la ecuación de GHK. La relación de permeabilidad para P_{Na}/P_K resultó ser de 0.2.

A) BLOQUEO POR TETRAETILAMONIO Y 4-AMINOPIRIDINA

Los canales de K^+ son típicamente sensibles al bloqueo por TEA^+ y 4-AP. Estos compuestos cargados positivamente se probaron sobre la corriente del tipo *Slo3*. El TEA^+ a 50 mM, concentración a la cual bloquea el 100 % de la mayoría de canales de K^+ (Dolly y Parcej, 1996), sólo bloqueó el 50 % de la corriente (fig. 12, panel superior). En contraste, 1 mM de 4-AP fue suficiente para bloquear la misma fracción de la corriente (fig. 12, panel inferior). Estos experimentos sugieren que el canal tipo *Slo3* es más sensible al bloqueo por 4-AP que por TEA^+ .

2) CANALES RECTIFICADORES TARDIOS

En el presente trabajo, además de la corriente descrita anteriormente se registró una segunda corriente saliente en las células espermatogénicas. La curva I-V de esta corriente (fig. 13) muestra que el canal se empieza a activar a -40 mV. Esta corriente no presentó inactivación y tiene una constante de tiempo de activación (τ_{act}) de 21.2 ms a 60 mV (fig. 13). A continuación se estudió su sensibilidad al bloqueo externo por el TEA^+ . Los resultados muestran que con 50 mM de TEA^+ se obtuvo un bloqueo del 100 % de la corriente, indicando que este canal tiene una mayor sensibilidad al TEA^+ que el *Slo3* (fig. 14). De esta manera, la segunda corriente saliente registrada en las células

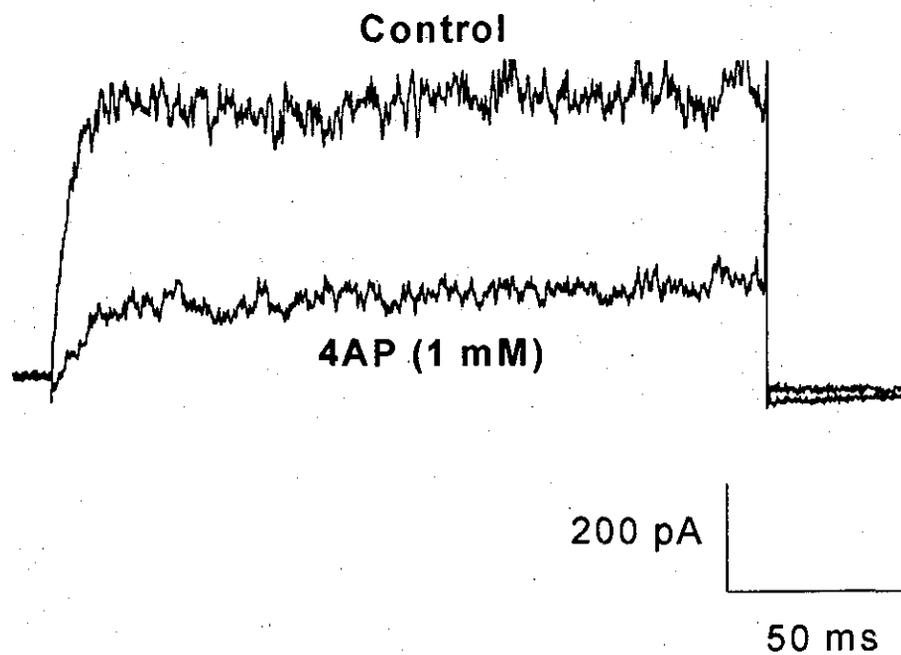
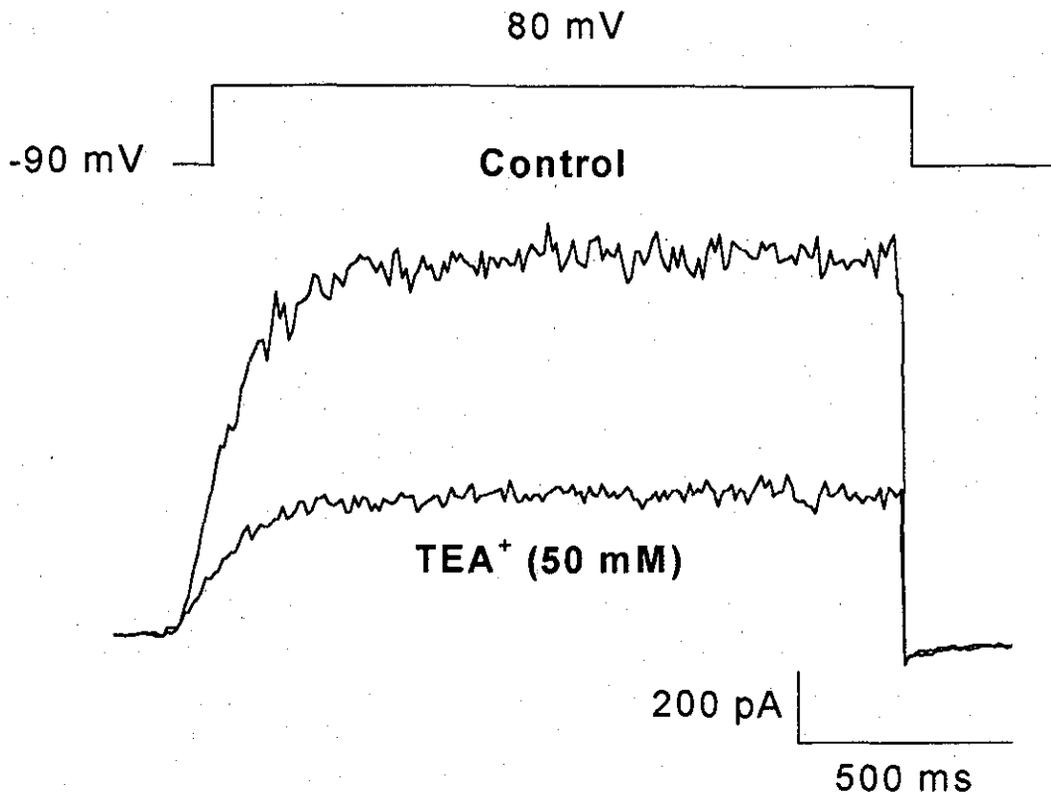


Figura 12. Bloqueo de la corriente tipo *Slo3* por TEA⁺ y 4AP. A) Efecto de 50 mM de TEA⁺ en la amplitud de la corriente. B) Efecto de 1 mM de 4AP en la amplitud de la corriente. La corriente entrante inactivante que se observa durante los primeros 50 ms es una corriente de Ca²⁺ tipo T. El protocolo de pulsos utilizado se ilustra en la parte superior del trazo.

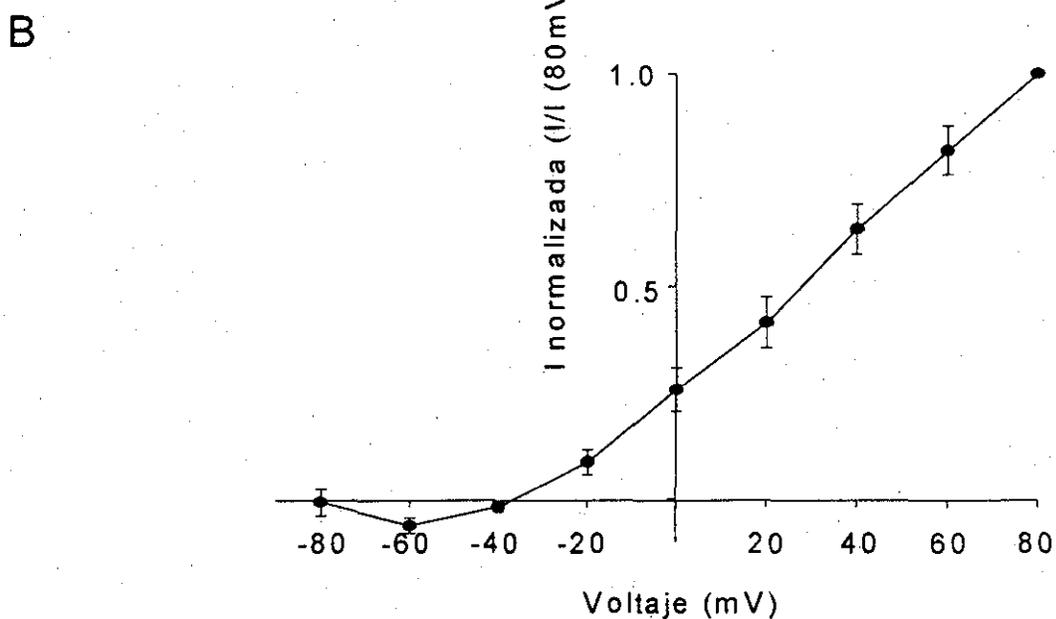
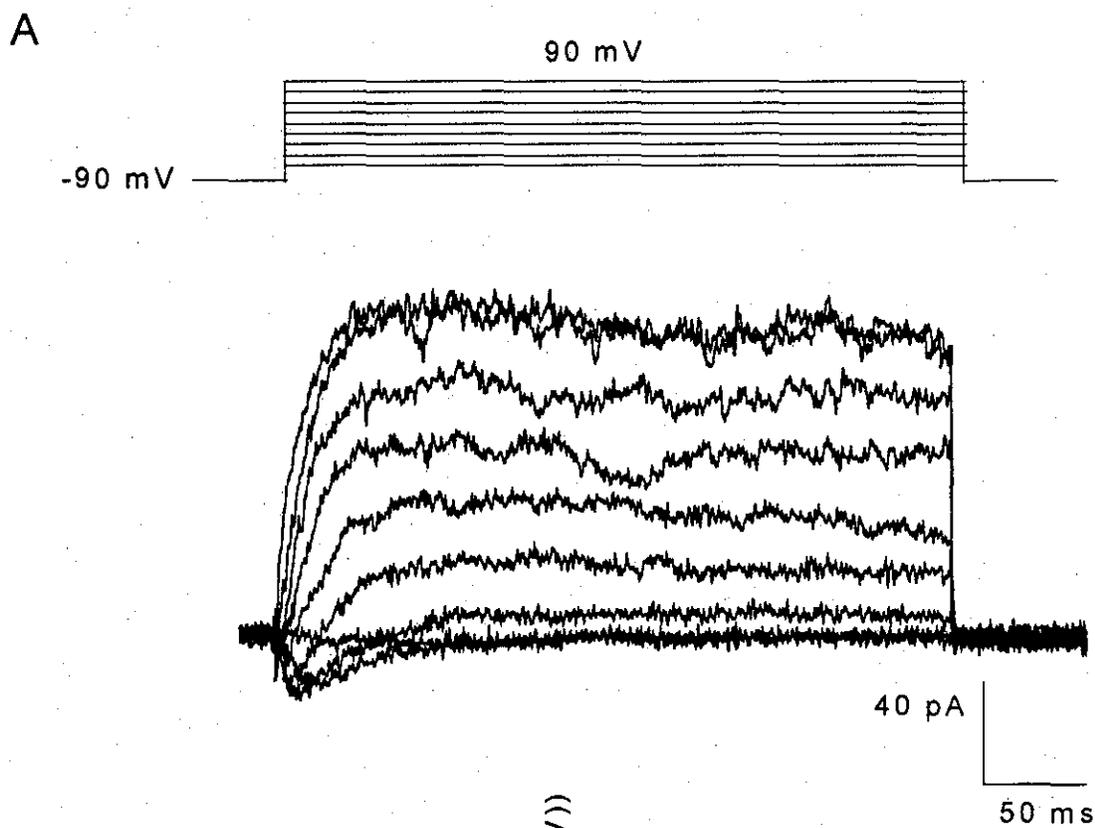


Figura 13. Corriente de célula completa a través del canal rectificador tardío. A) Trazos de corrientes obtenidas de células espermatozóidas, el protocolo de voltaje se esquematiza en la parte superior del trazo. B) Curva I-V, la corriente se normalizó respecto a la amplitud de la corriente en estado estacionario al voltaje de 80 mV. Los puntos son el promedio de 4 experimentos independientes, con su respectiva \pm DE.

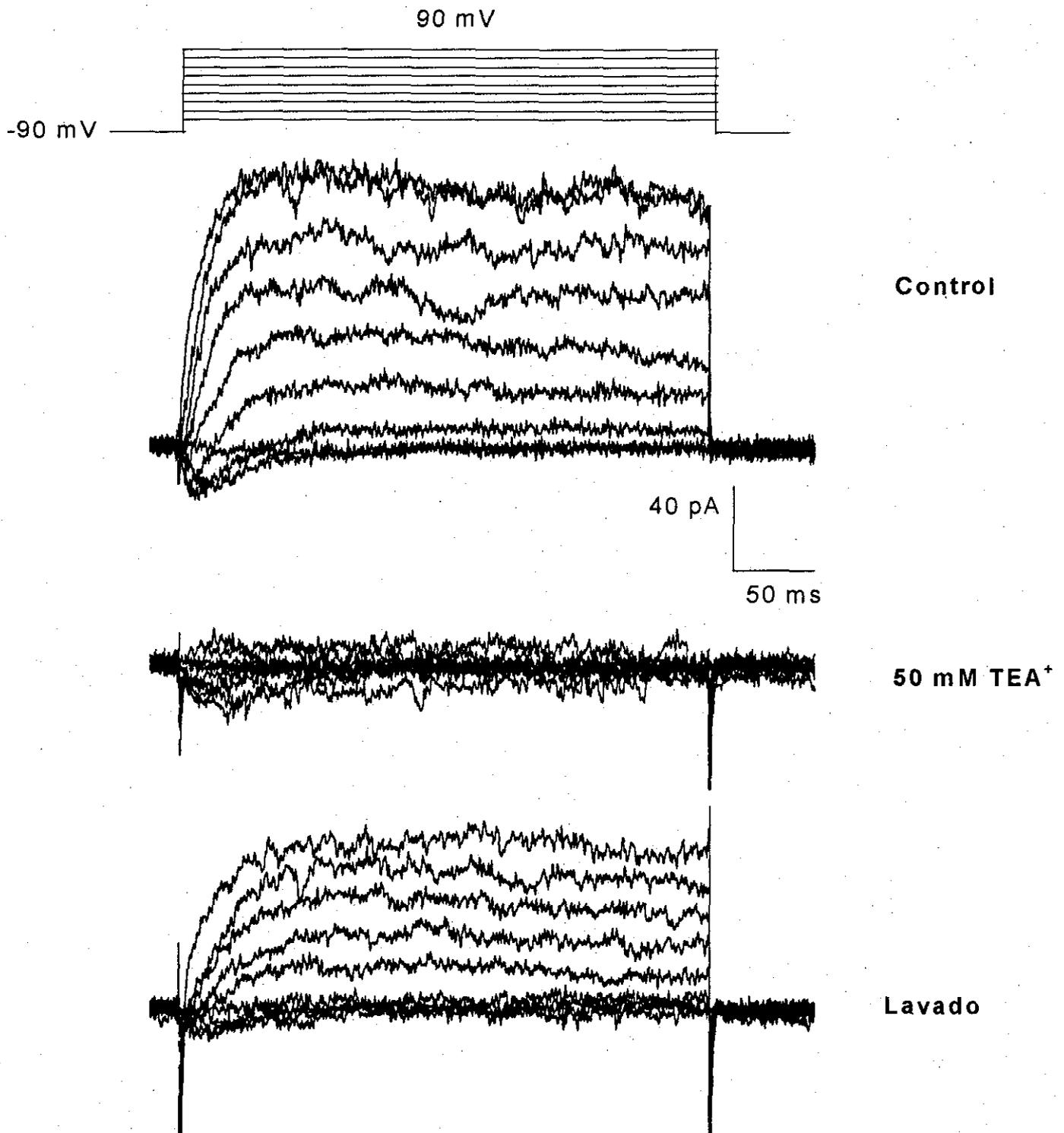


Figura 14. Efecto del TEA⁺ sobre el canal rectificador tardío. Registros electrofisiológicos de célula completa en espermatogénicas de ratón, en solución contro, en presencia de 50 mM de TEA⁺ y despues de haber removido el TEA⁺, como se indica en la figura.

espermatogénicas del ratón comparte muchas características con la corriente de K^+ registrada en las células espermatogénicas de la rata originalmente descrita por Hawigara y Kawa (1984), en su trabajo pionero.

3) CANALES K_{ir}

En el presente trabajo, además de las corrientes salientes, se encontró evidencia de la presencia de un canal de K^+ rectificador entrante en las células espermatogénicas del ratón. La caracterización de este canal se realizó mediante experimentos de fijación de voltaje en la configuración de célula completa y en condiciones equimolares de K^+ (150 mM). Un ejemplo de la corriente registrada se presenta en la figura 15A, donde se puede ver que se trata de una corriente de muy rápida activación, sin inactivación aparente a los voltajes y tiempos probados (-130 mV y 1800 ms). Asimismo, la corriente aumenta en respuesta a pulsos de voltaje hiperpolarizantes más alejados del E_K (fig. 15B). Al igual que en los registros de la corriente saliente, en este caso también se usaron soluciones equimolares y bajas en Cl^- , para evitar la contaminación de corrientes de Cl^- previamente reportadas (Espinoza, *et al.*, 1998).

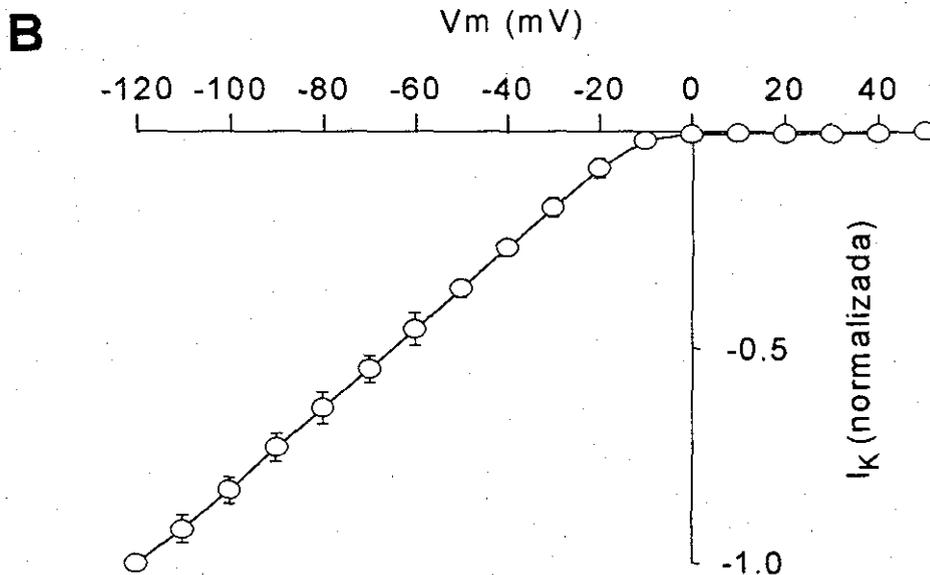
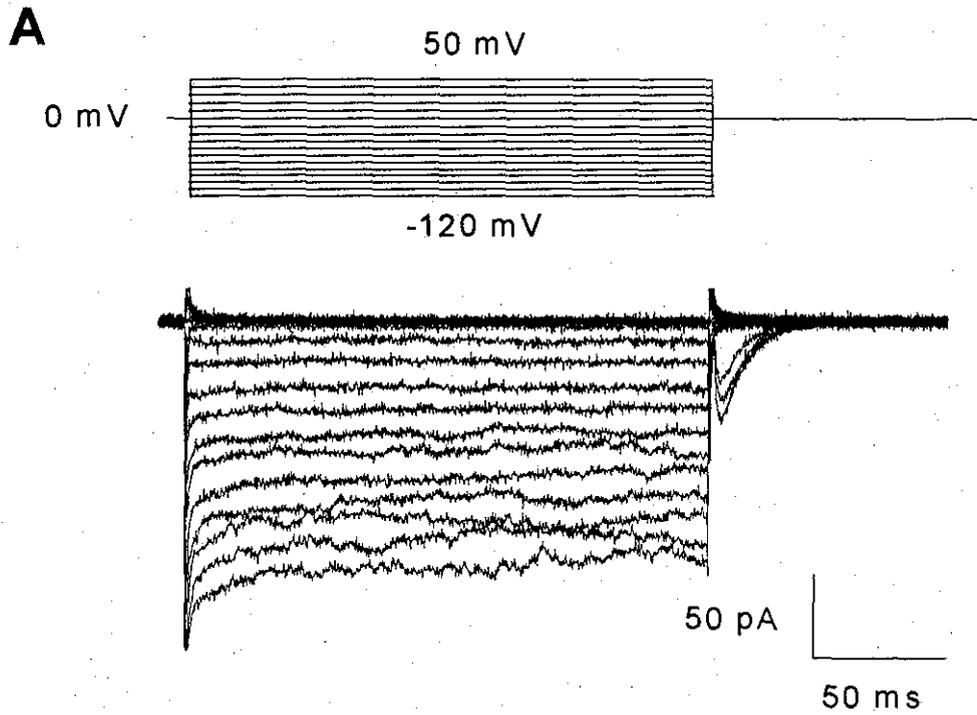


Figura 15. Corriente entrante de K^+ en células espermatozógenas de ratón. A) Corriente típica en respuesta a cambios de voltaje de 10 mV entre -110 y 50 mV iniciando de un potencial de mantenimiento de 0 mV en condiciones equimolares de K^+ (tabla 3, BSI y PSI). La corriente que se observa al final del trazo se atribuye a la apertura de canales de Ca^{2+} a 0 mV. La representación esquemática del protocolo de voltajes se muestra arriba de los trazos. B) Curva Corriente-Voltaje. La corriente está normalizada a la máxima amplitud (-120 mV). Cada símbolo representa el promedio y \pm DE de 9 células, cabe destacar que el voltaje al que rectifica la corriente coincide con el E_K .

A) PROPIEDADES FUNDAMENTALES

El K_{ext} como determinante de la corriente

Para determinar la identidad de la corriente entrante se desarrollaron experimentos en los que se pudiera valorar la dependencia a K^+ de esta corriente. El reemplazo equimolar de K^+ externo con N-Metil-D-Glucamina ($NMDG^+$) o Na^+ mostró que ambos cationes son considerablemente menos permeables que el K^+ . La Figura 16A muestra trazos de una corriente típica de célula completa en respuesta a un pulso a -80 mV a partir de un HP de 0 mV, con una duración de 1.8 segundos. En presencia de 128 mM KSO_3 en el medio externo, los experimentos revelan una corriente de rápida activación que no se inactiva durante el pulso. El reemplazo de K^+ por Na^+ o $NMDG^+$ disminuye completamente la corriente entrante. La figura 16B compara las amplitudes medias de las corrientes a -110 mV normalizadas por la capacitancia de la membrana celular obtenidas en presencia de K^+ , Na^+ y $NMDG^+$.

Rectificación dependiente del E_K

Para corroborar que la corriente registrada en células espermatozógenicas se debía a la activación de canales rectificadores entrantes selectivos a K^+ , se realizó una serie de experimentos de fijación de voltaje en presencia de diferentes concentraciones de K^+ externo (128 , 60 y 30 mM; tabla 3 SBIV, V, VI). En estos se mantuvo fija la concentración interna de K^+ (150 mM, tabla 3 SPI) y se observó que el potencial de inversión fue distinto en función de la relación entre las concentraciones interna y externa de K^+ . Dicha relación se ajusta a lo establecido en la ecuación de Nernst para un

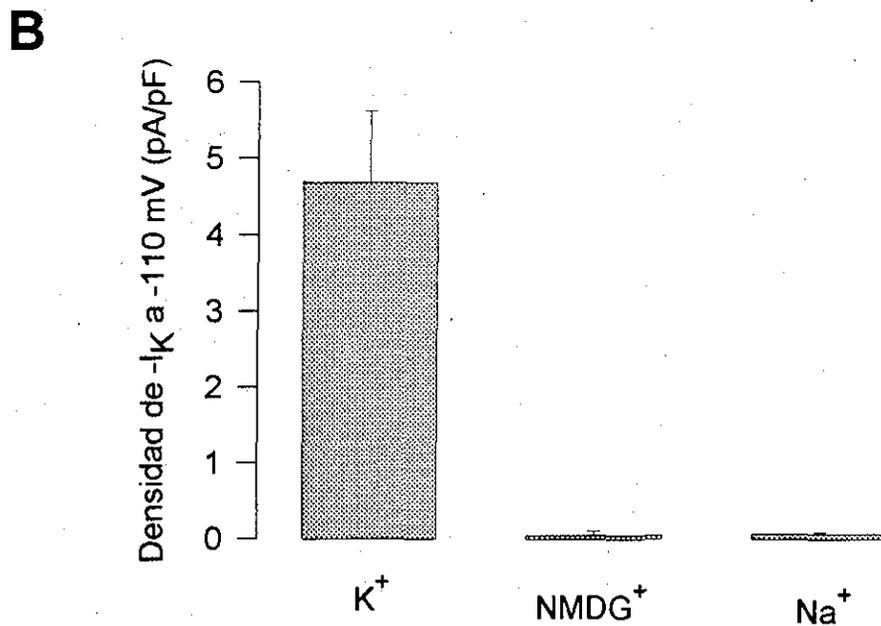
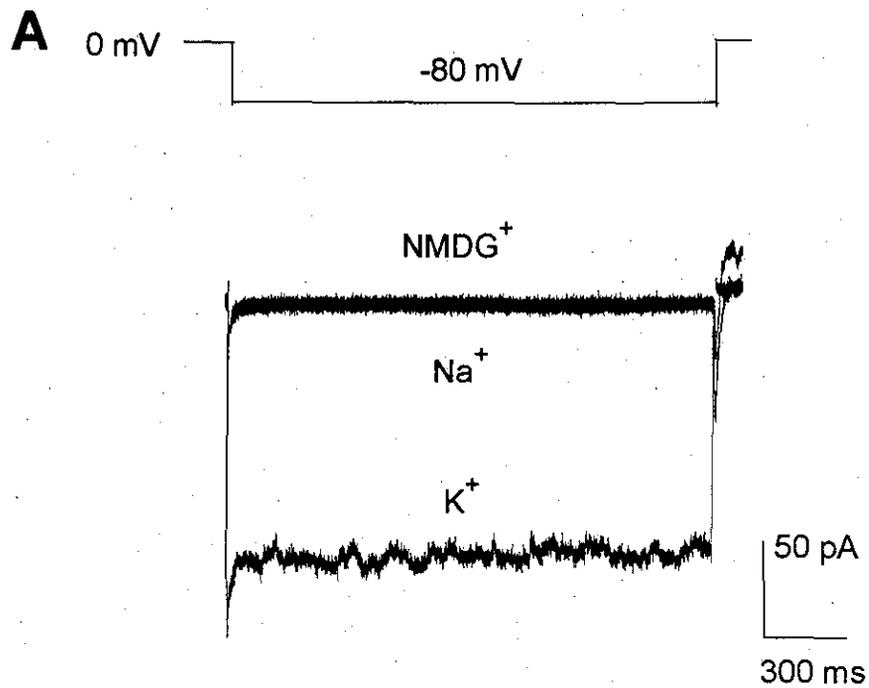


Figura 16. Dependencia de la corriente al K⁺ externo. A) Efecto sobre la corriente entrante al sustituir K⁺ por Na⁺ o NMDG⁺ en la solución externa. El protocolo de voltaje se muestra en la parte superior del trazo. B) Densidad de la corriente entrante para cada uno de los iones extracelulares empleados, la barra representa la media de $n=3$ y la línea vertical \pm DE.

canal altamente selectivo que se comporta como un electrodo específico para un ion en particular (fig. 17A). De este modo, se concluye que el canal K_{ir} es dependiente y altamente selectivo al K^+ . Los canales registrados en estas células se comportan como los clásicos rectificadores entrantes, es decir, a potenciales positivos al E_K la corriente saliente es mucho más pequeña que a voltajes a la izquierda del E_K . La figura 17B muestra los potenciales de inversión (E_{inv}) obtenidos experimentalmente en función de la concentración externa de K^+ (círculos abiertos). Claramente, los puntos se ajustan muy bien a la función de la ecuación de Nernst (línea continua). Estos datos muestran la alta selectividad del canal por el ion K^+ y la influencia del E_{inv} en la rectificación del canal.

La curva conductancia voltaje ($g-V$) muestra el valor de la conductancia en función del incremento en el voltaje con respecto al E_K . En la figura 18A se grafica la curva $g-V$ de la corriente K_{ir} , normalizando a la máxima g (-110mV). Dicha curva se puede describir bien con una función sigmoide de la forma $g=I_x/(E-E_x)$, donde g es la conductancia, I_x la corriente del ion en estudio, E el voltaje de prueba y E_x el potencial de inversión del ion X. Interesantemente, en la curva $g-V$ se observa que a voltajes a la derecha del E_K existe una pequeña conductancia de aproximadamente el 9 % de la conductancia total. Esto ocurre cuando el E_K es cero, es decir en condiciones equimolares del ion. Con la idea de investigar con más detalle como esta fracción se comportaba en función del K^+ externo y del E_K , a continuación se analizaron las curvas $g-V$ a tres diferentes concentraciones de K^+ externo obtenidas en una misma célula (fig. 18B). En estos

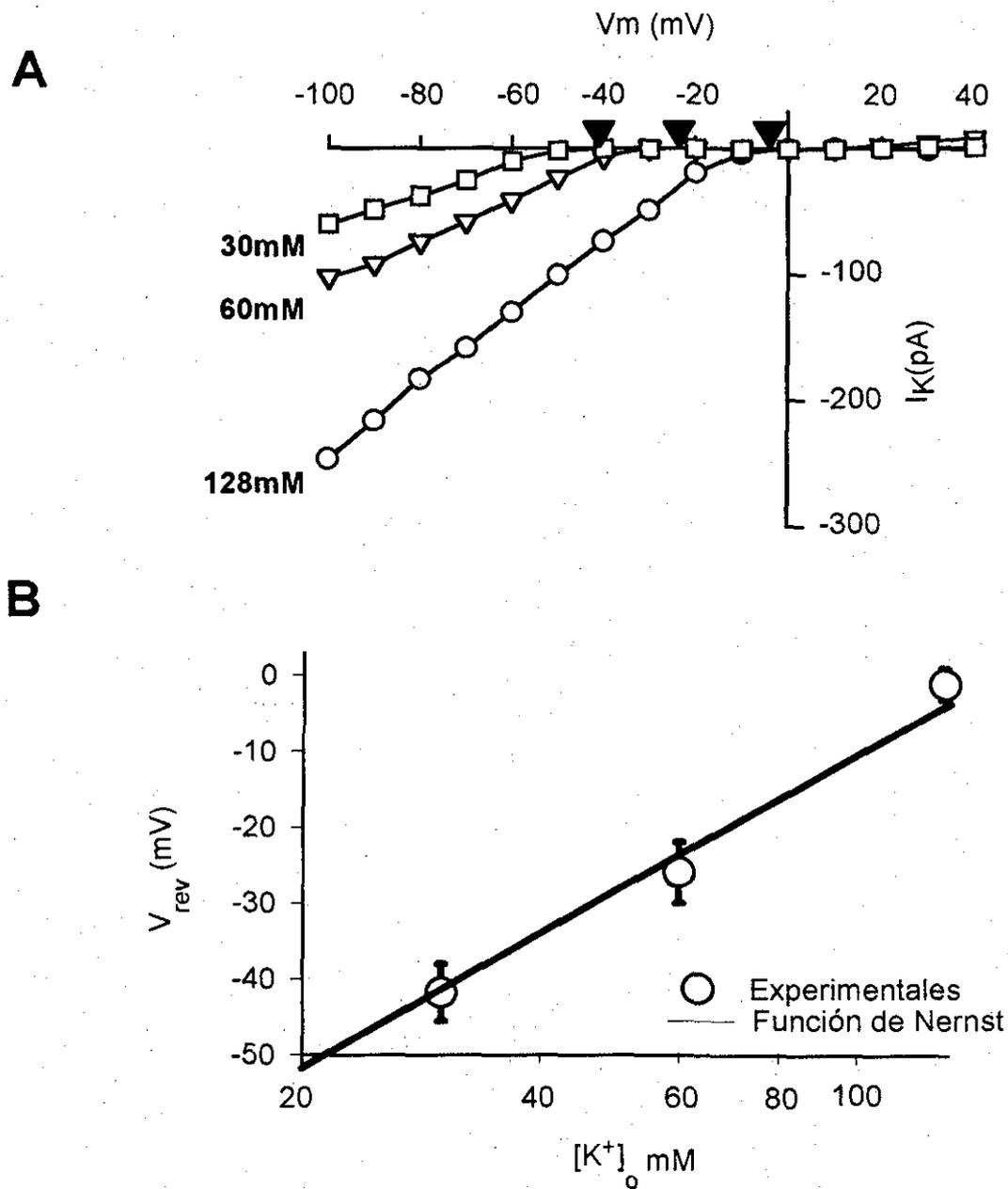


Figura 17. Relación corriente voltaje del canal K_{ir} para 3 diferentes concentraciones de K^+ externo. A) Curva I-V del registro en una misma célula en presencia de diferentes concentraciones de K^+ externo. En la figura se aprecia el cambio del voltaje al que rectifica el canal. Los triángulos llenos en el eje X indican el potencial de inversión del ión K^+ para las tres diferentes concentraciones utilizadas. B) Correlación de los potenciales de inversión con la ecuación de Nernst. Los círculos representan la media de al menos 5 células con su respectiva \pm DE y la línea continua representa el comportamiento de la ecuación de Nernst en función de la concentración de K^+ externo. Nótese que los datos experimentales se ajustan a la ecuación.

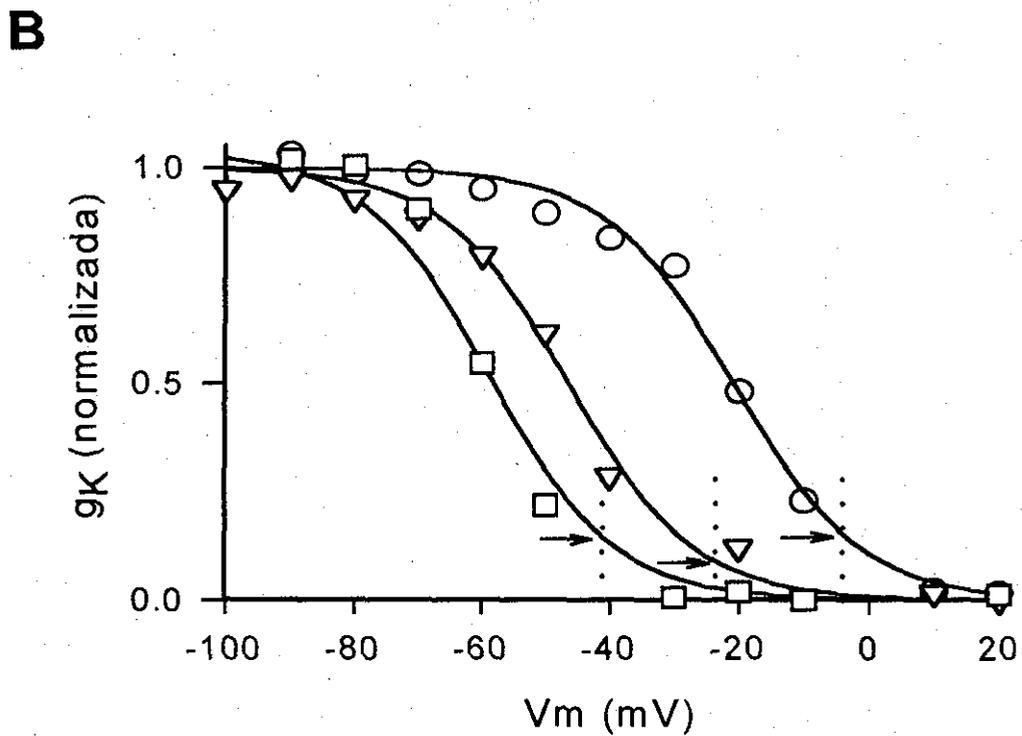
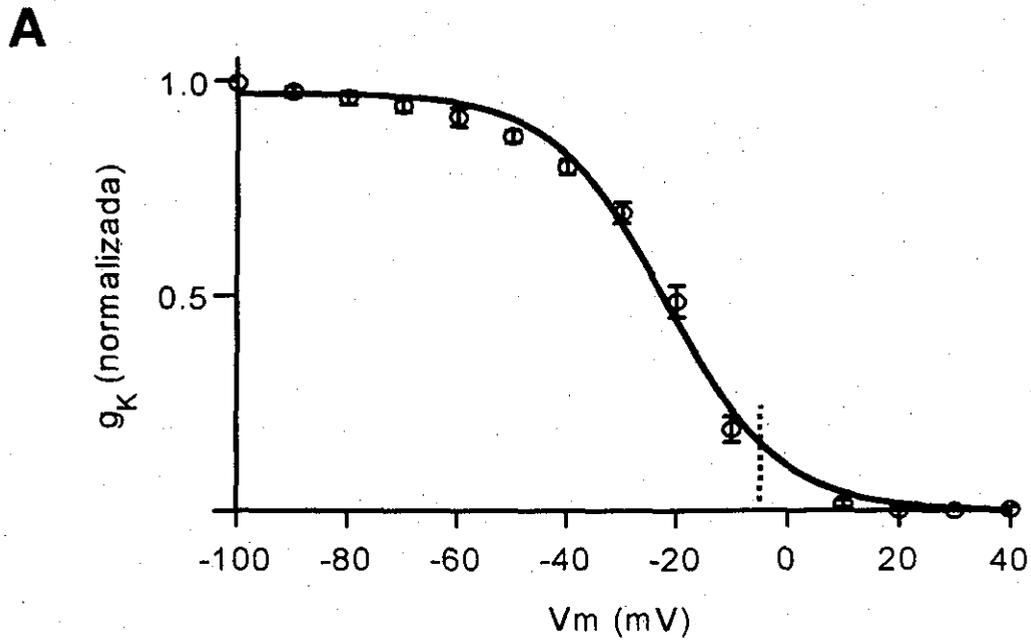


Figura 18. Curva conductancia voltaje del canal K_{ir}. A) Curva g-V, los símbolos son el promedio de 9 células registradas de forma independiente con su respectiva \pm ES. B) Curvas g-V de una misma célula, registrada bajo diferentes concentraciones de K⁺ externo. Círculos 128, triángulos 60 y cuadros 30 mM de K⁺, la línea punteada indica los diferentes E_K. Obsérvese que existe una fracción de canales (indicada por las flechas) dispuestos a abrirse a voltajes aún a la derecha del E_K.

experimentos cabe resaltar que la conductancia a la derecha del E_K se mantuvo en la misma proporción para los tres casos. De manera similar a la curva descrita anteriormente, las curvas se ajustaron muy bien a una función sigmoide y resultaron paralelas entre ellas. Uno de los parámetros más informativos que se obtiene de dichos ajustes es la $V_{1/2}$, que es el voltaje al cual se tiene la mitad de la conductancia máxima. Al graficar la $V_{1/2}$ en función de la $[K]_e$ se obtiene una recta de la cual es posible obtener la $V_{1/2}$ para $[K^+]_e$ dentro del rango fisiológico (fig. 19A). A partir de dichos parámetros se puede simular la curva $g-V$ para una concentración de 5 mM de K^+ externo que esta dentro del rango de concentraciones fisiológicas. Esta simulación se presenta en la figura 19B mediante una línea punteada y para comparación se muestra en la misma grafica los ajustes de los valores experimentales obtenidos para tres distintas concentraciones externas de K^+ en una misma célula. Al hacer esta simulación se pudo observar que la fracción de canales que están dispuestos a abrirse es mayor que lo que en nuestras condiciones experimentales observamos. Esto nos permite proponer que al igual que otros muchos canales de este tipo, su papel en la célula es permitir la salida de K^+ del interior celular, dado que el potencial de membrana del espermatozoide está siempre a la derecha del E_K en condiciones fisiológicas.

Permeabilidad a Rb^+ y Na^+

El siguiente paso en la caracterización de los canales de K^+ rectificadores entrantes encontrados en las células espermátogénicas fue investigar su selectividad. Para ello se recurrió al reemplazo del $[K^+]_{ext}$ con Rb^+ o Na^+ . Se registraron corrientes de simplastos

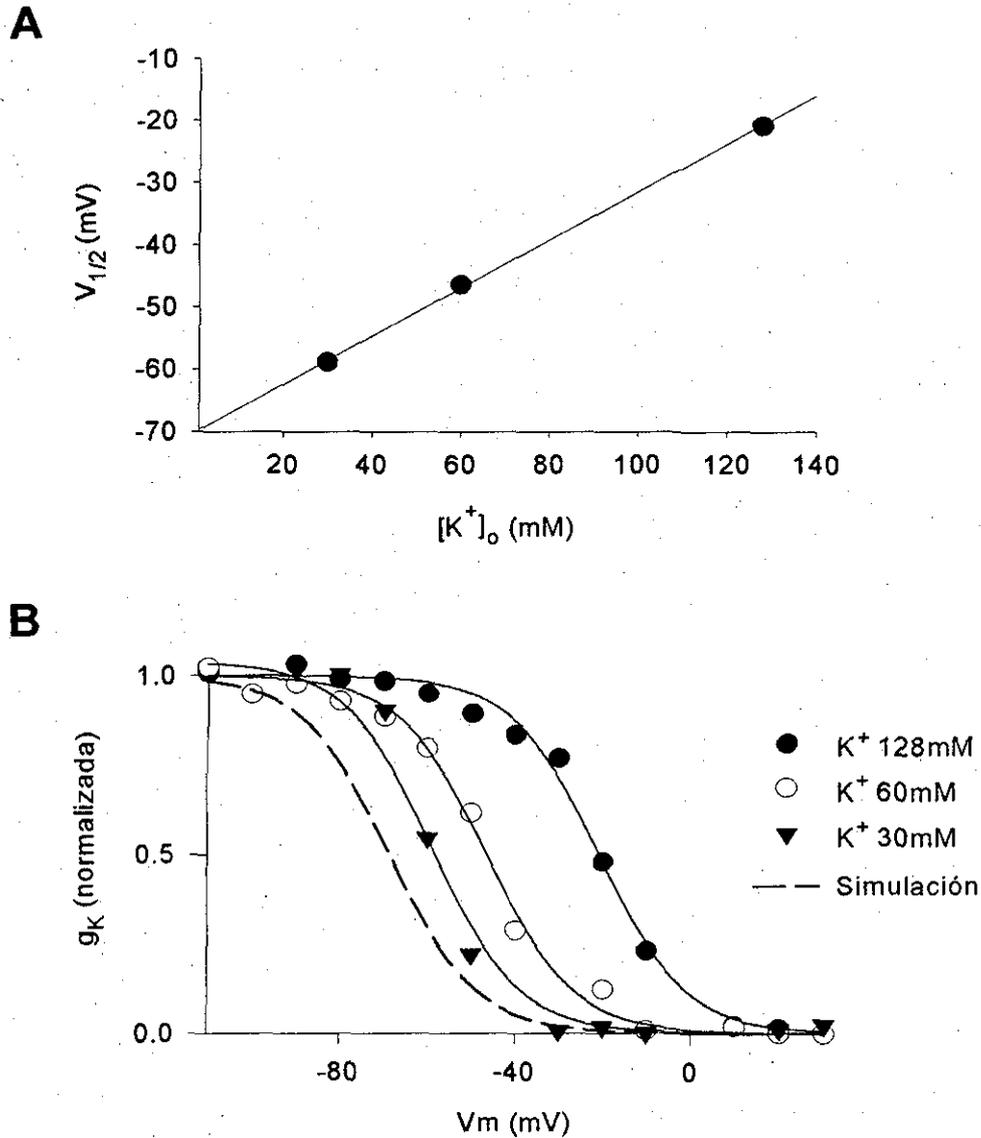


Figura 19. Estimación de la $V_{1/2}$ para concentraciones fisiológicas de K^+ extracelular. A) Gráfica de las $V_{1/2}$ obtenidas experimentalmente con respecto a la concentración de K^+ externo. De esta recta se pudo estimar que para 5 mM de $[K^+]_e$ la $V_{1/2}$ es de 68.5 mV. B) Simulación de la curva g - V para una concentración de 5 mM de $[K^+]_e$. Tomando los mismos parámetros obtenidos de los ajustes de los datos experimentales y la $V_{1/2}$ que se tomó de la extrapolación, se simuló la g - V (línea punteada). Las líneas continuas son los ajustes de los datos experimentales obtenidos en diferentes $[K^+]_e$ (símbolos en círculos y triángulos). Obsérvese que la fracción de canales disponibles a abrirse a voltajes a la derecha del E_K en K^+ externo fisiológico es mucho mas grande de lo estimado en condiciones experimentales.

con 150 mM K⁺ interno y los otros cationes externos tal y como lo muestra la figura 20A. Por su parte, la figura 20B muestra la curva I-V obtenida al substituir 60 mM de K⁺ por una cantidad igual de Rb⁺ o Na⁺. A partir de estos experimentos, las razones de permeabilidad de Rb⁺ y Na⁺ sobre K⁺ se estimaron usando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK).

$$E_{rev} = \frac{(RT)}{(zF)} \ln \left(\frac{P_A[A]_o}{P_B[B]_i} \right)$$

Donde R es la constante de los gases; T es la temperatura en °K; z es igual a la valencia del ion; F representa la constante de Faraday; P es la permeabilidad para cada determinado ion; A y B, son iones monovalentes. De esta ecuación se puede despejar la relación P_A/P_B.

Los resultados del análisis utilizando la ecuación de GHK muestran valores de P_X/P_K de 0.21 y <0.021 para Rb⁺ y Na⁺ respectivamente, los cuales son muy similares a los reportados para otros canales K_{ir} (ver tabla 1). De esta manera, el patrón de selectividad que se obtuvo fue: K⁺ > Rb⁺ > Na⁺. Con base en estas mediciones de selectividad iónica se pudo establecer que el canal muestra el mismo patrón de selectividad que otros canales de K⁺ rectificadores entrantes reportados anteriormente (ver tabla 1, Hille, 1992).

B) BLOQUEO POR Ba²⁺ Y Cs⁺

Una de las principales características de los canales K_{ir} es su susceptibilidad al bloqueo por Ba²⁺ y Cs⁺ (ver tabla 2). La figura 21A muestra el efecto de 300 μM de Ba²⁺ o Cs⁺

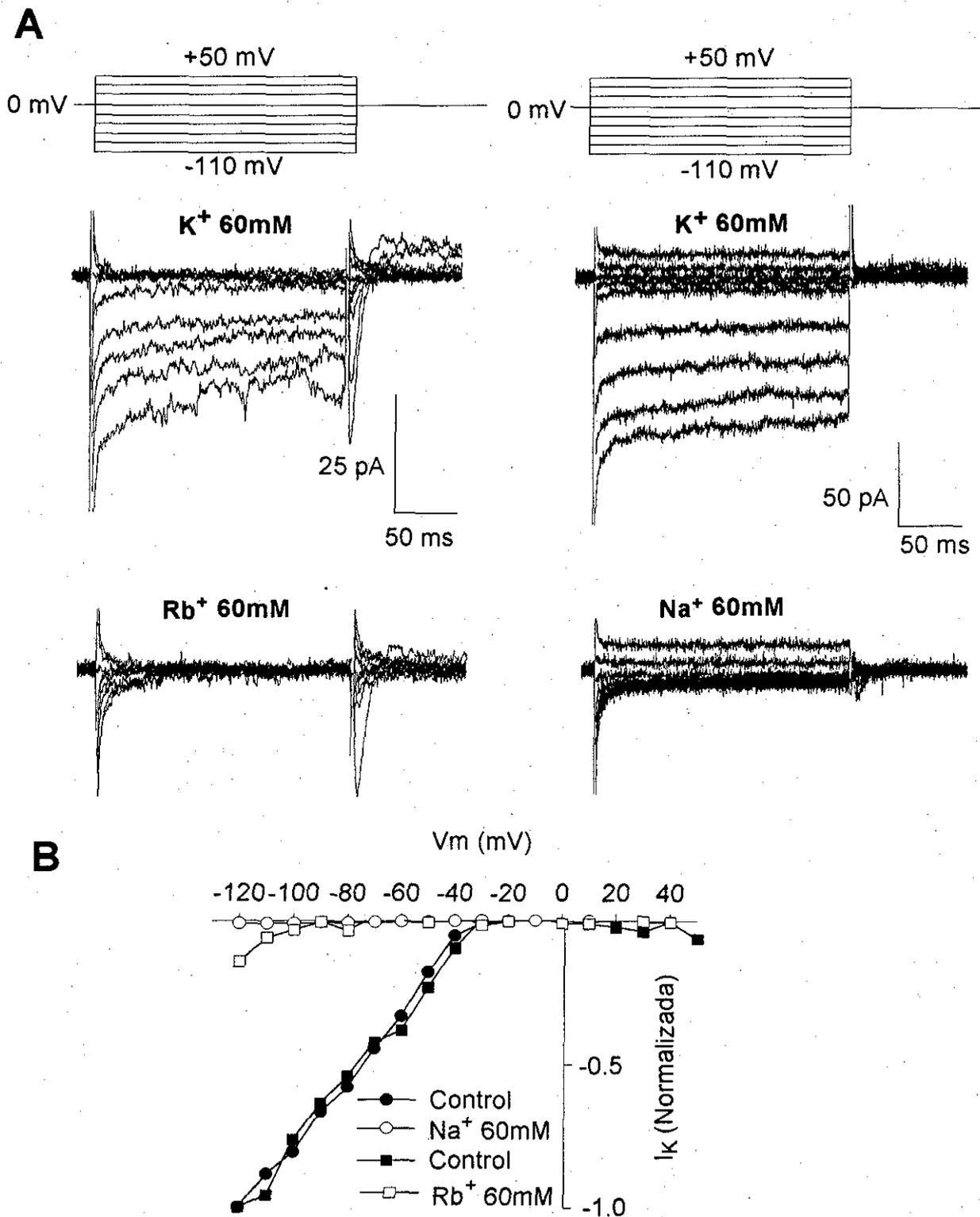


Figura 20. Permeabilidad del canal K_{ir} a Rb^+ y Na^+ . A) Registros de corriente entrante en presencia de 60 mM de K externo (control, panel superior) o sustitución de K^+ por Rb^+ o Na^+ panel inferior). B) Curva I-V de las mismas corrientes mostradas en A obtenidas en solución control símbolos llenos (tabla 3, solución BSVII) y soluciones conteniendo Na^+ o Rb^+ símbolos vacíos (tabla 3, soluciones BSVIII y BSIX respectivamente).

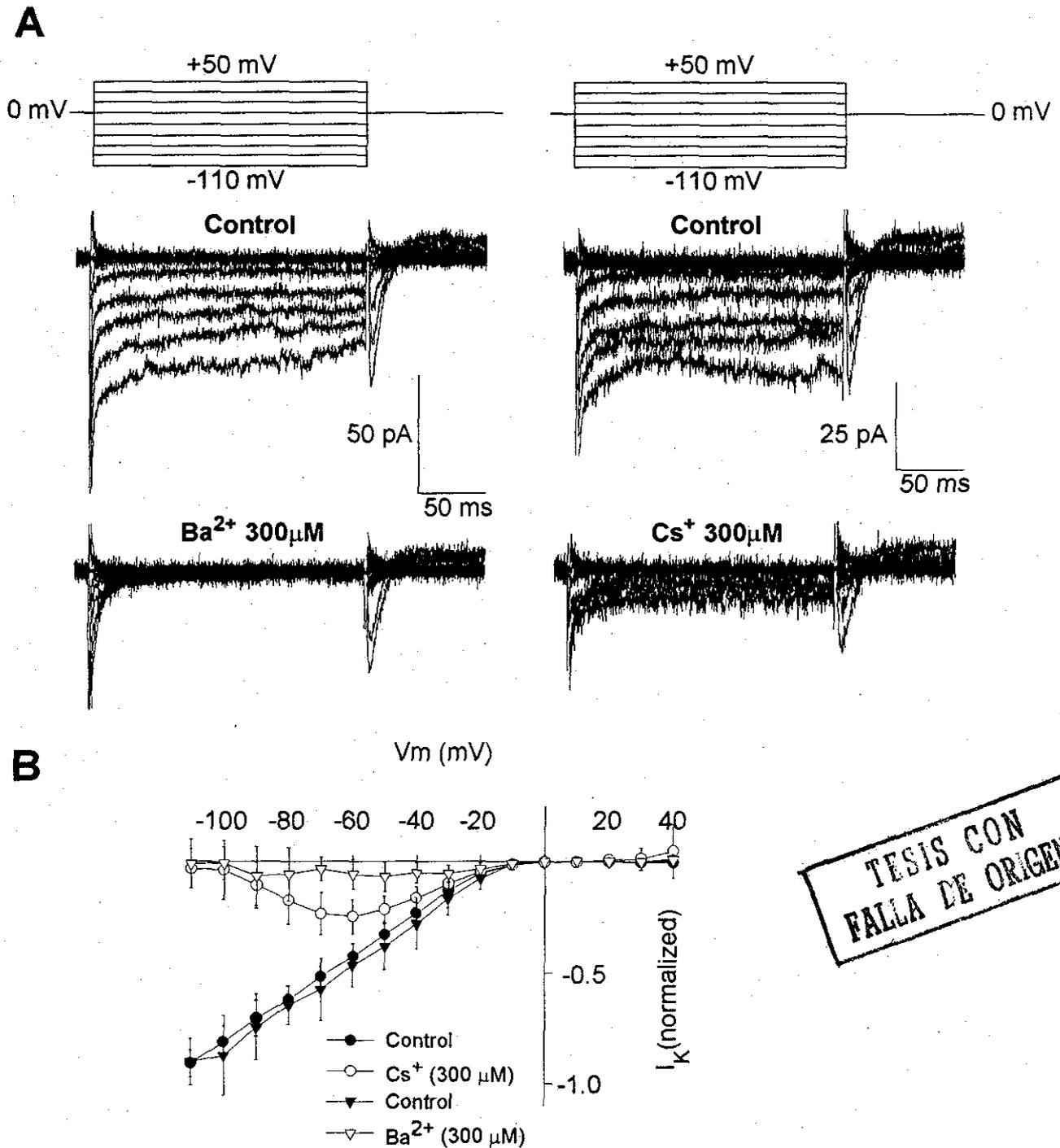


Figura 21. Bloqueo del canal K_{ir} por Ba^{2+} y Rb^+ . A) Registros de corriente entrante en respuesta a pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de 0 mV, antes y después de perfundir con una solución control (tabla 3, BSI) suplementada con $300\mu\text{M}$ de Ba^{2+} o Cs^+ , respectivamente. B) Curva I-V de la amplitud de la corriente en estado estacionario obtenida de al menos 3 células como las mostradas en A.

agregados a la solución del baño sobre la corriente de célula completa. En presencia de Ba^{2+} o Cs^+ externo, la amplitud de la corriente macroscópica se abatió completamente a todos los voltajes probados (fig. 21). La figura 21B resume los resultados obtenidos en 3 experimentos independientes donde la disminución de la amplitud de la corriente en presencia de Ba^{2+} o Cs^+ se grafica en función del voltaje. Estos resultados confirman la presencia en las células espermatozógenicas de un canal K_{ir} con alta sensibilidad tanto a Ba^{2+} como a Cs^+ . Para evaluar cuantitativamente el grado de bloqueo por el Ba^{2+} se construyó una curva dosis-respuesta utilizando valores de la corriente medida en el estado-estacionario a -90 mV en presencia de diferentes concentraciones extracelulares del ion. Como se ilustra en la figura 22, el efecto del Ba^{2+} es dosis-dependiente y el 100 % del bloqueo de la corriente se logra a concentraciones por arriba de $300 \mu M$. Los datos normalizados se ajustaron a una función sigmoide de la forma $f = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b))$, donde, $a =$ y máxima; $1 =$ corriente total; $x =$ concentración de Ba^{2+} dada; $x_0 = IC_{50}$; $b =$ factor de pendiente, de donde se pudo estimar una concentración que bloquea la mitad de la corriente (IC_{50}) es de $15.4 \mu M$.

Por otro lado, el bloqueo ocasionado por Cs^+ extracelular también es dependiente de la concentración, pero mostró una mayor dependencia al voltaje que para el caso del bloqueo por Ba^{2+} . El Cs^+ tiene mayor afinidad a voltajes menores a -60 mV y bloquea muy poco a potenciales de membrana más positivos que -50 mV (fig. 21B). La dependencia del bloqueo por Cs^+ al voltaje se puede apreciar al graficar la fracción bloqueada de la corriente contra el voltaje de prueba para una concentración (fig. 23).

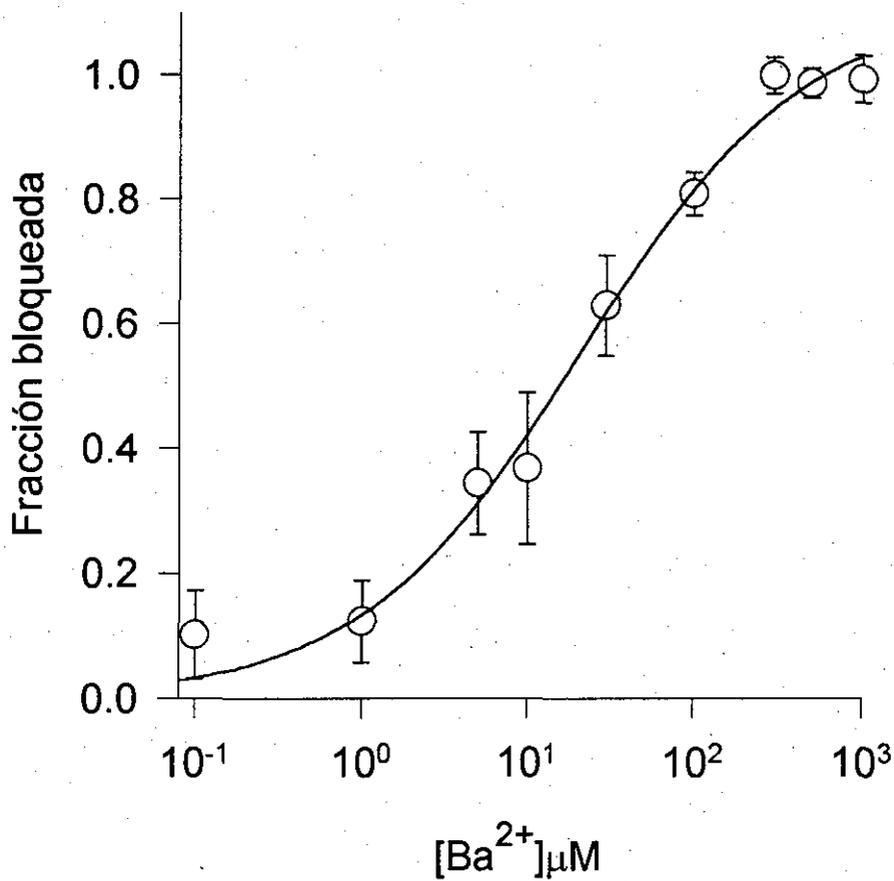


Figura 22. Curva Dosis-Respuesta del bloqueo por Ba²⁺. Fracción de la corriente bloqueada en función de la concentración de Ba²⁺, los símbolos representan el promedio de 3-7 células con su respectiva \pm DE. Los datos se ajustaron a una función del tipo $f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ de la cual se puede estimar una IC₅₀ de 15.4 μ M.

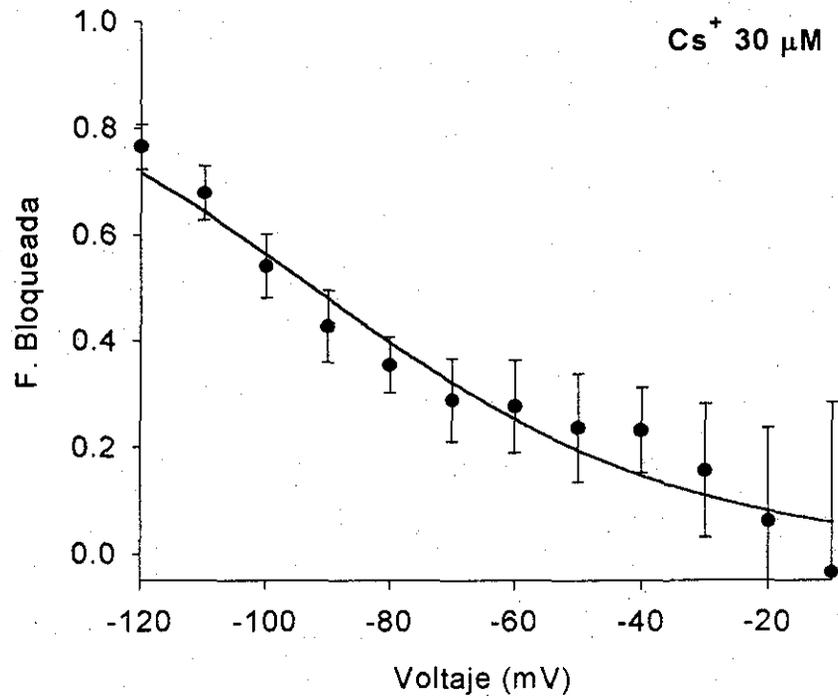
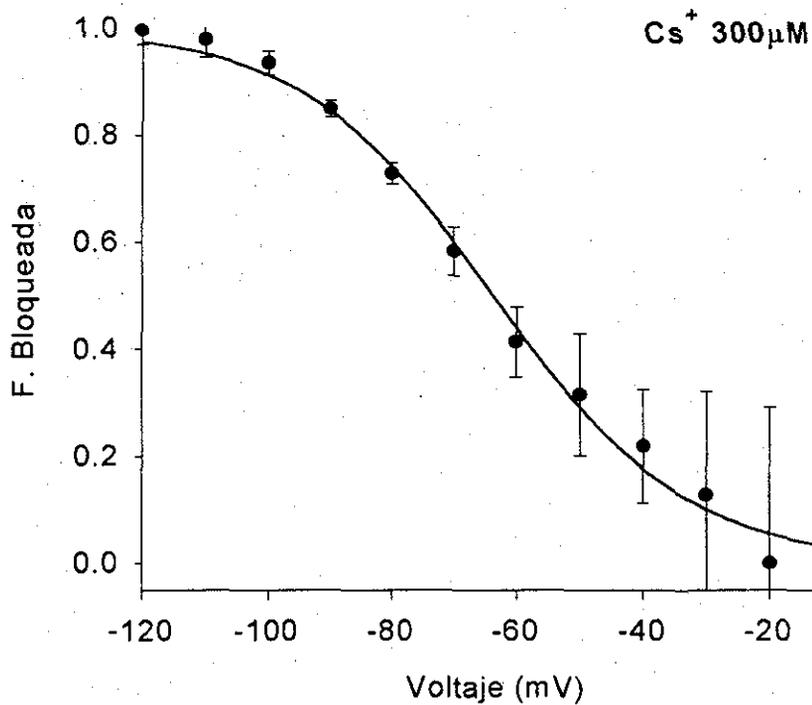
A**B**

Figura 23. Bloqueo del canal K_{ir} por Cs^+ es dependiente del voltaje. Fracción bloqueada del canal K_{ir} respecto al voltaje para 30 y $300 \mu M$ de Cs^+ (A y B, respectivamente). Los resultados fueron ajustados a una función de Woodhull, que describe el bloqueo dependiente de voltaje. Los puntos que se grafican son la media de tres experimentos independientes con su respectiva \pm DE.

Los datos experimentales del bloqueo por Cs^+ dependiente del voltaje se pueden describir mediante la función de Woodhull (1973) que describe el bloqueo dependiente de voltaje.

C) MECANISMOS DE RECTIFICACIÓN

Los mecanismos de rectificación en este tipo de canales se han estudiado ampliamente. En la literatura se reporta que la rectificación puede darse por un bloqueo del canal, del lado interno, por poliaminas y/o iones de Mg^{2+} . Esto ocurre a voltajes por arriba del E_K . El mecanismo de rectificación de los canales K_{ir} presentes en las células espermatozógenas se estudió mediante el uso de un pulso muy depolarizante (100 mV). A este voltaje la entidad molecular (Mg^{2+} y/o poliaminas) que bloquea el lado interno del canal propicia la rectificación. La figura 24 muestra el resultado del efecto del Mg^{2+} interno en este bloqueo. Las células espermatozógenas se dializaron con una de dos soluciones internas (tabla 3 SPI y SPII). La solución control contenía 1mM de Mg^{2+} en la forma de MgCl_2 . La solución de la pipeta que se consideró como 0 Mg^{2+} no contenía este ion y además se utilizó el quelante EDTA (en lugar del EGTA) ya que tiene mayor afinidad por el Mg^{2+} . Las células se registraron a concentraciones equimolares de K^+ . Todos los registros se comenzaron 2 minutos después de la formación del sello en la configuración de célula completa ya que a este tiempo se establece el equilibrio entre la solución de la pipeta y el citoplasma celular. La figura 24A muestra una familia de corrientes entrantes en presencia de Mg^{2+} interno. El protocolo de pulsos utilizado se ilustra en la parte superior de los trazos.

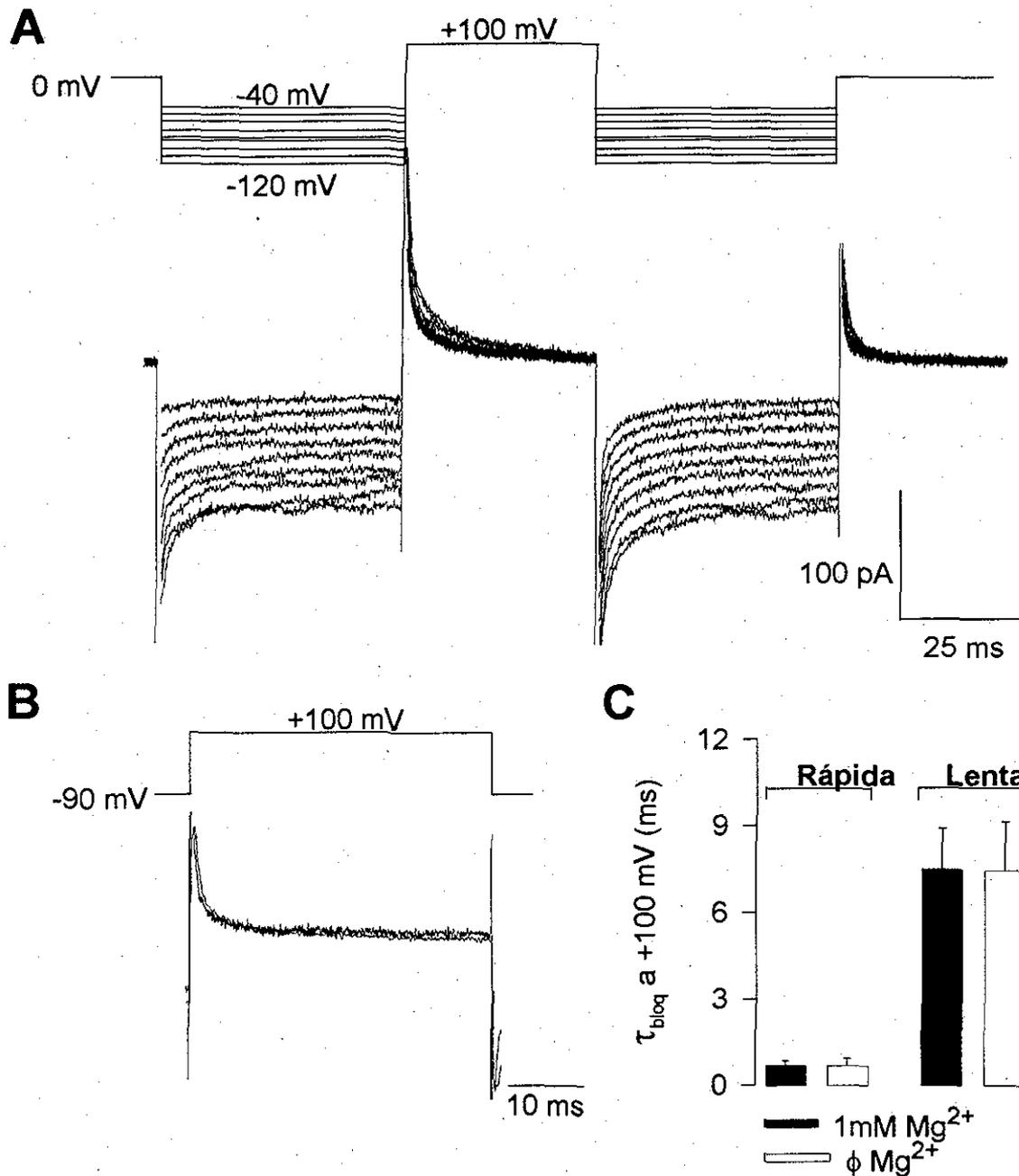


Figura 24. Participación del Mg^{2+} en la rectificación del canal K_{ir} . A) Registro de una familia de corrientes de K^+ evocada por un protocolo de pulsos tal y como se indica en la parte superior del trazo. El registro se obtuvo con una solución externa alta en K^+ (tabla3, BSI) y una solución control en la pipeta con 1mM de Mg^{2+} (Tabla3, PSI). B) Dos registros independientes, uno con una solución en la pipeta que contenía 1mM de Mg^{2+} y otro con una solución sin Mg^{2+} y 5 mM de EDTA (Tabla3, PSI y PSII respectivamente). Los trazos se muestran sólo en el voltaje y tiempo de interés (100mV y 40ms respectivamente) en donde el proceso de bloqueo por Mg^{2+} interno ocurre. La cinética de la corriente describe el bloqueo del canal. C) Comportamiento de la cinética de bloqueo en función de la presencia de Mg^{2+} .

Así, a voltajes tan depolarizados como 100 mV, la corriente saliente decae muy rápidamente describiendo el bloqueo interno que da la rectificación. El curso temporal de esta corriente se describe muy bien por una función exponencial de segundo orden y se observa que las constantes de tiempo del bloqueo, rápida y lenta (τ_{rap} y τ_{len}) no se modifican en soluciones sin Mg^{2+} en comparación con la presencia de 1 mM de Mg^{2+} . A 100 mV la τ_{rap} es 0.7 ± 0.2 y 0.7 ± 0.3 ms para el control ($n=6$) y 0 Mg^{2+} ($n=3$) respectivamente. Mientras que al mismo voltaje τ_{len} es de 7.5 ± 1.4 y 7.4 ± 1.7 ms respectivamente. De forma interesante, la corriente del K_{ir} no se modifica cuando la solución intracelular no contiene Mg^{2+} (fig. 24B y C). La figura 24B muestra sólo dos trazos en presencia y ausencia de Mg^{2+} , para una mejor comparación. De este tipo de experimentos se puede concluir que el Mg^{2+} no parece tener una participación importante en la rectificación del canal tal como se reportado para otros canales K_{ir} en trabajos sobre mecanismos moleculares de la rectificación (Hille 1992; Fakler, *et al.*, 1996).

D) MODULACIÓN POR pH INTRACELULAR

Con la idea de investigar la vía de modulación de este canal y dado que algunos miembros de la superfamilia K_{ir} son sujetos a modulación por cambios en el pH_i , a continuación se estudiaron las corrientes macroscópicas de células espermatozógenas en función de cambios en el pH_i . La figura 25 muestra la dependencia a pH de los canales K_{ir} presentes en las células espermatozógenas. Las células se mantuvieron a un HP de 0 mV durante el registro. En estos experimentos el pH de la solución externa (150 mM

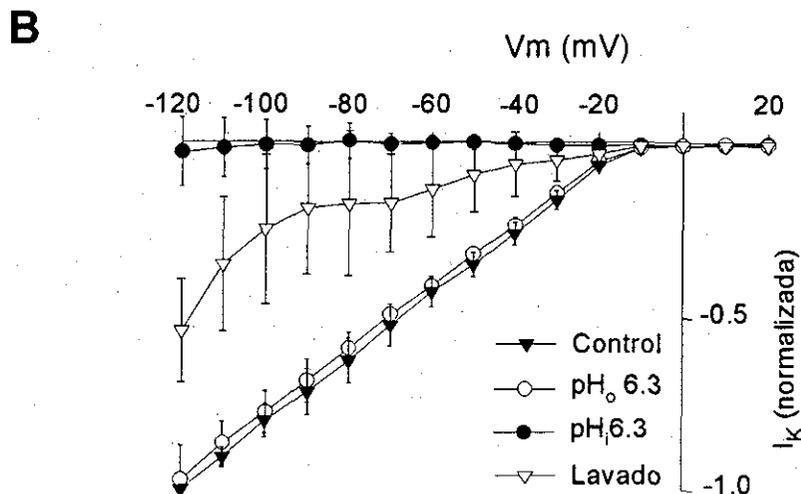
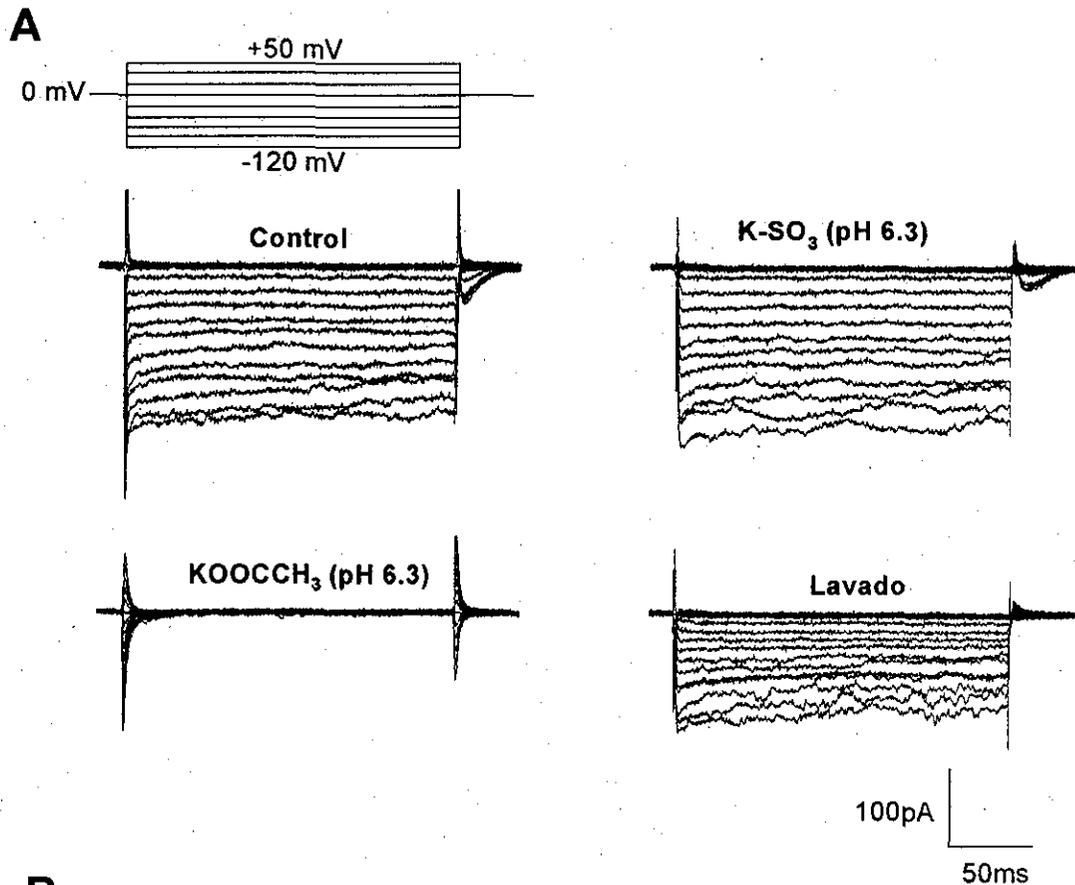


Figura 25. Regulación del canal K_{ir} por pH_i . A) Registros electrofisiológicos del canal K_{ir} bajo distintas condiciones de pH intra y extracelular en una misma célula, como se indica en cada trazo. Los registros se obtuvieron con una solución en la pipeta baja en HEPES (Tabla3, PSIII). La célula se perfundió con distintas soluciones externas en el siguiente orden; control K-MeSO₃, pH7.4; K-MeSO₃, pH 6.3; KOOCCH₃, pH 6.3 y el lavado (Tabla3, BSI, XII, XI, I, respectivamente). B) Curva I-V de la corriente normalizada a la máxima corriente a -130 mV, mostrando el promedio de 4-9 experimentos independientes y su \pm DE en las diferentes condiciones como indica la leyenda.

KSO₃) se cambió de 7.4 (panel superior izquierdo) a 6.3 por ajuste con MeSO₄ (panel superior derecho) y se compararon las corrientes de la célula completa. Interesantemente, los cambios en el pH_e no modificaron la amplitud de la corriente ($n=4-7$). Por otro lado, se sabe que pueden generarse modificaciones en el pH_i mediante el uso de soluciones de acetato de K⁺ permeable a la membrana (Choe, *et al.*, 1997), ya que el acetato se distribuye por difusión entre el exterior y el interior celular formando ácido acético en el interior de la célula. Para investigar el efecto de pH_i sobre la conductancia macroscópica se decidió entonces utilizar una solución en el baño que contenía (en mM) 75 de KSO₃ y 75 de KOOCCH₃ y se ajustó el pH a 6.3 (con MeSO₄). El uso de acetato de K⁺ permeable en la solución externa indujo una completa inhibición de la corriente (panel inferior izquierdo). Dicho efecto se pudo revertir parcialmente al lavar con la solución control, 150 mM de KSO₃ (panel inferior derecho). Aunque en estos experimentos no fue posible medir directamente el pH_i, de acuerdo con datos previos de la literatura se puede suponer que el pH_i tiende a igualarse al pH_e. Las curvas I-V generadas en estos experimentos se muestran en la figura 25B, en la cual se comparan los valores de las corrientes durante una disminución en el pH_e del baño de 7.4 a 6.3 en presencia o ausencia de acetato ($n=6-9$), así como la reversibilidad del efecto (ver leyenda de la figura). Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el canal rectificador entrante registrado en células espermatozógenas, es sensible al pH_i y no al pH_e.

E) EFECTO DEL Ba^{2+} SOBRE ESPERMATOZOIDES MADUROS

Efecto de Ba^{2+} durante la capacitación y la reacción acrosomal

El potencial de membrana de los espermatozoides se hiperpolariza durante la capacitación *in vitro* (de aproximadamente -50 a -80 mV; Arnoult, *et al.*, 1999). Para establecer si esta hiperpolarización se correlaciona con la activación de canales K_{ir} , se analizó el efecto del Ba^{2+} a bajas concentraciones (300 μ M) en el proceso de capacitación. Sacando ventaja del hecho de que sólo los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo la RA en respuesta a la ZP, se midió la RA como una forma indirecta de la capacitación. La figura 26A muestra que sólo una fracción de aproximadamente 10 % de los espermatozoides incubados en medio carente del inductor ZP sufren RA (RA espontánea) (espontánea). En comparación, un porcentaje significativo de los espermatozoides incubados en un medio con ZP desarrollan RA (inducida con ZP). De forma interesante, el porcentaje de RA disminuyó significativamente cuando las células se preincubaron con 300 μ M de Ba^{2+} durante la capacitación (300 μ M Ba^{2+} + ZP). Por otro lado, se realizaron experimentos para discernir si el efecto inhibitorio del Ba^{2+} tenía lugar durante la capacitación y/o la RA. Para ello, en una serie inicial de experimentos los espermatozoides se dejaron capacitar por media hora en ausencia de Ba^{2+} , y 5 segundos antes de agregar ZP, se suministró 300 μ M de Ba^{2+} . En estos experimentos no se observó un efecto del Ba^{2+} sobre la RA (fig. 26 ZP + 300 μ M Ba^{2+}). De estos experimentos se puede concluir que el efecto del Ba^{2+} ocurre durante la capacitación y no en el proceso de la RA. Como un control del efecto específico del Ba^{2+} sobre la capacitación y de la viabilidad celular en presencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

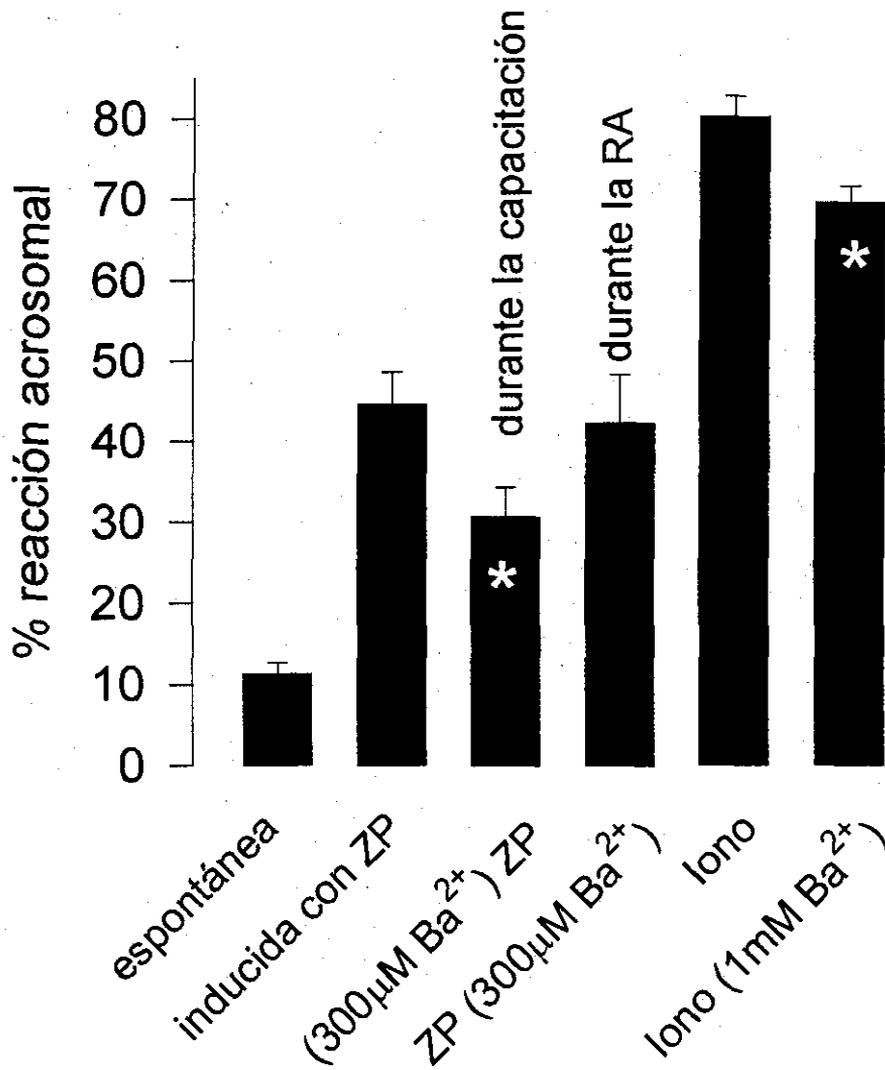


Figura 26. Efecto de Ba^{2+} sobre la capacitación y la RA. Determinación del % de RA como medida indirecta de la capacitación. Los espermatozoides de ratón fueron incubados en presencia de ZP durante 30 min y la RA se midió como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la RA espontánea que ocurre en ausencia y presencia del inductor fisiológico con o sin Ba^{2+} (300 μ M), como se indica. Dos de las muestras se incubaron 30 minutos en presencia de 15 μ M ionomicina (iono) solas o en presencia de Ba^{2+} como un control positivo ($n=5$ y 10 respectivamente). Los datos representan la media \pm DE de por lo menos 4 experimentos independientes. El asterisco indica que la diferencia con el control de la media es estadísticamente significativa.

de Ba^{2+} , se realizaron experimentos de RA inducidos por ionomicina, un ionóforo para Ca^{2+} que induce RA de modo independiente a la capacitación (barra 5 y 6). El efecto del Ba^{2+} tuvo un 10 % de efecto sobre la RA inducida por el ionóforo.

Efecto de Ba^{2+} sobre el E_m del espermatozoide

Como alternativa para analizar las consecuencias de manipular la corriente del canal K_{ir} en los espermatozoides durante la capacitación *in vitro*, se midió el E_m utilizando un fluoróforo sensible al voltaje. El E_m de los espermatozoides en reposo que se estimó por este método fue de -52 ± 6 mV ($n=10$ determinaciones separadas). En comparación, el E_m de espermatozoides que ya culminaron la capacitación *in vitro* resultó más negativo, -68 ± 6 mV (fig. 27) tal y como se había reportado anteriormente (Arnould, *et al.*, 1999). Interesantemente, el E_m de las células capacitadas en presencia de 1 mM de Ba^{2+} se mantuvo en valores muy similares a aquellos de células sin capacitar (-53 ± 7 mV), sugiriendo que el bloqueo del canal de K_{ir} por el Ba^{2+} durante la capacitación previene la hiperpolarización de la membrana (Fig. 27).

Se ha descrito previamente que otros canales de K^+ pueden bloquearse inespecíficamente con altas concentraciones de Ba^{2+} (Nichols and Lopatin 1997). En las células espermátogénicas, tal y como se ha descrito en el presente trabajo, se han registrado dos tipos de canales altamente selectivos a K^+ , por lo que a continuación se probó el efecto de 1mM de Ba^{2+} en ambas corrientes. La figura 28A muestra corrientes de K^+ de célula completa sobrepuestas, en ausencia o presencia de 1mM de Ba^{2+}

externo. Aquí se puede ver que la adición de Ba^{2+} a la solución del baño reduce de manera evidente la amplitud de la corriente entrante (trazo superior), pero no la corriente saliente (trazo inferior). El porcentaje del efecto de Ba^{2+} en éstas corrientes se compara en la figura 28B. Estos resultados muestran que concentraciones de Ba^{2+} (1 mM) bloquean completamente la corriente del K_{ir} (fig. 28) pero no afecta la corriente saliente. Por lo tanto de manera secundaria, estos datos apoyan fuertemente la idea de que el efecto de Ba^{2+} sobre el potencial de membrana del espermatozoide se debe a un bloqueo de los canales K_{ir} y no sobre el rectificador tardío.

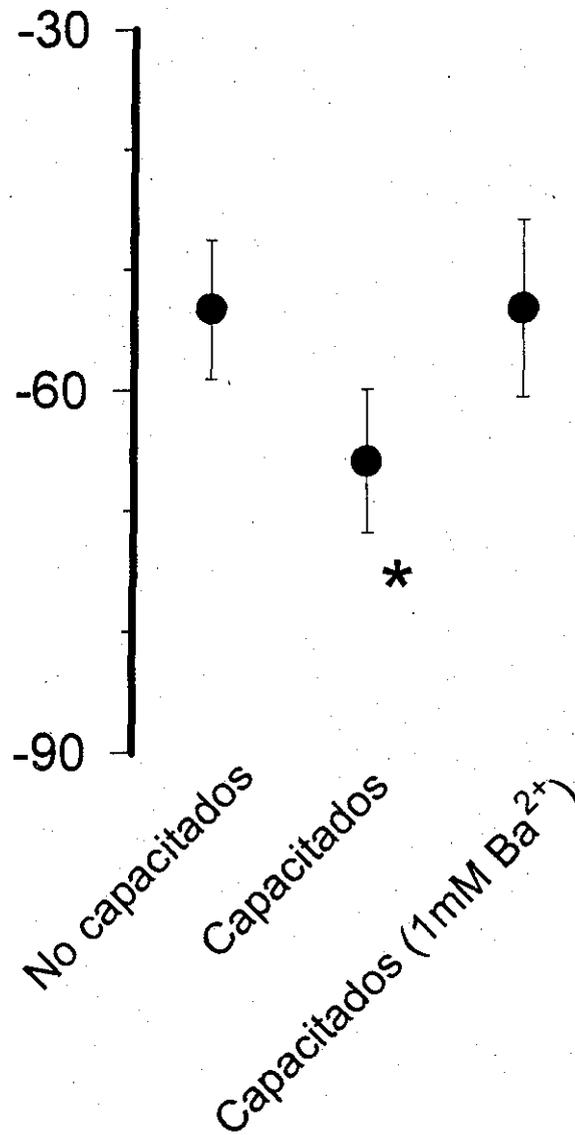
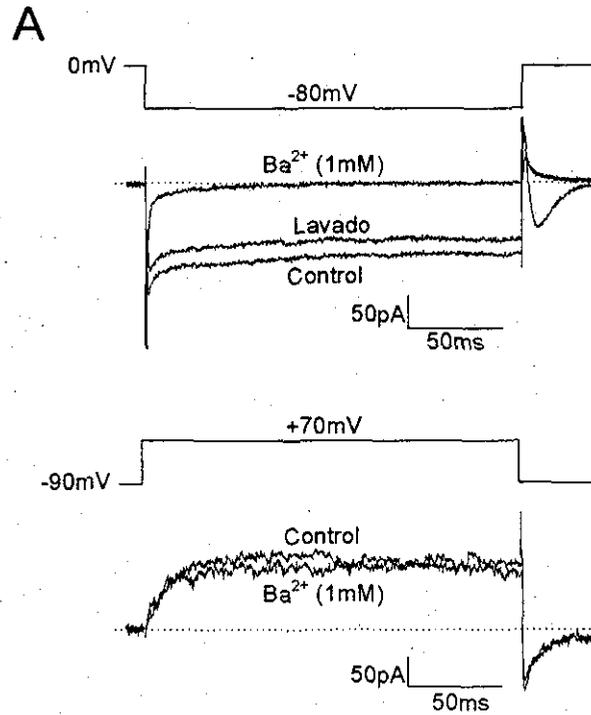


Figura 27. Efecto de Ba²⁺ sobre la hiperpolarización del E_m que ocurre durante la capacitación. El cambio del potencial de membrana entre células no capacitadas y capacitadas se aprecia en la diferencia que existe entre las dos primeras cajas, mientras que el efecto de Ba²⁺ (1mM) se evidencia al comparar las 2 últimas. El asterisco indica que la diferencia de la media es estadísticamente significativa.



B

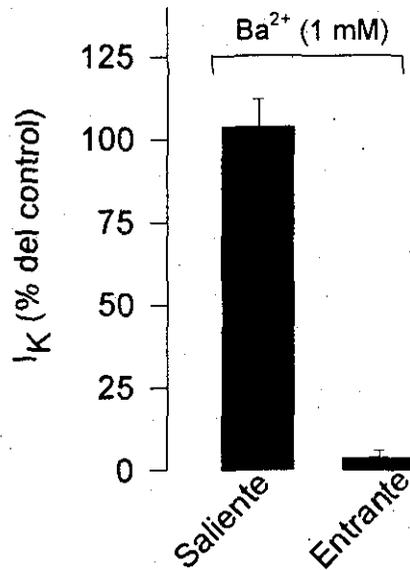


Figura 28. Especificidad de Ba²⁺ sobre el canal K_{ir}. A) Registros sobrepuestos de la corriente entrante (panel superior) y saliente (panel inferior) de K⁺ obtenidas de células espermatogénicas representativas antes y después de la exposición a Ba²⁺ (1mM). La línea punteada marca el nivel de cero corriente. Los registros se obtuvieron utilizando el protocolo de pulsos de voltaje que se ilustra arriba de cada trazo. B) Resumen estadístico de la amplitud de la corriente de K⁺ en presencia de 1mM de Ba²⁺ como en A ($n=4$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El proceso de fecundación en los mamíferos es un evento fisiológico bastante estudiado. Pese a ello, muchas de las interrogantes fundamentales continúan sin una respuesta definitiva. En el presente trabajo se desarrollaron una serie de experimentos que permitieron ayudar a entender como es que proteínas como los canales iónicos participan en ciertos procesos previos indispensables a la fecundación, que ocurren en el espermatozoide como son la capacitación y la RA.

El estudio de los canales iónicos en el espermatozoide de mamífero es un campo relativamente nuevo y pobremente estudiado. El empleo de técnicas nuevas en la caracterización de dichas proteínas, como la electrofisiología y el uso de marcadores iónicos fluorescentes han ayudado en gran medida a la caracterización de los canales. Sin embargo, en el caso particular del espermatozoide de mamífero el uso de estas técnicas no ha resultado trivial, debido a su muy particular naturaleza anatómica y funcional.

Como alternativa, en 1994 se utilizó la técnica de fijación de voltaje en la configuración "inside-out" en vesículas de espermatozoides de bovino y de humano. En ese trabajo se

identifico un canal catiónico modulado por GMPc. Dicho canal se clonó a partir de un banco de ADNc de bovino y se expresó en un sistema heterólogo. Actualmente, no existen evidencias experimentales que permitan establecer su relevancia fisiológica en el proceso de la fecundación (Weyand, *et al.*, 1994).

Una estrategia alternativa para estudiar canales en el espermatozoide es el uso de las células espermatogénicas. Durante la espermatogénesis, los últimos estadios previos al espermatozoide maduro (paquiteno, espermátida redonda y espermátida condensante) tienden a deshacerse de su maquinaria de síntesis proteica (Gillam, *et al.*, 1979). Considerando esto, se ha sugerido que las proteínas que requerirá el espermatozoide maduro durante el proceso de fecundación ya están presentes en estos estadios celulares. Ya que estas células son más grandes, permiten el uso de técnicas electrofisiológicas convencionales que pueden dar luz sobre los tipos de canales iónicos que tendrá el espermatozoide maduro. No obstante, cualquier conclusión derivada del estudio de las células espermatogénicas debe validarse con experimentos realizados directamente en espermatozoides maduros, como la determinación del E_m , capacitación, RA y ensayos de inmuno-detección cuando sea el caso.

En 1984, Hawigara y Kawa registraron por primera vez corrientes iónicas en células espermatogénicas de rata haciendo uso del "Patch Clamp" en la configuración de célula completa. Ellos encontraron dos tipos de corrientes claramente distinguibles entre sí, una de ellas fue una corriente entrante de Ca^{2+} , que en los últimos años se ha venido

caracterizando en detalle. Sin embargo, de la otra corriente, una corriente entrante de K^+ no se sabe más de lo reportado inicialmente por estos autores.

Por otro lado, algunos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la importancia del K^+ durante la capacitación. Así, los espermatozoides capacitados en altas concentraciones de K^+ externo muestran una menor eficiencia de RA (Arnoult, *et al.*, 1999). Con estos antecedentes resultaba de suma importancia determinar hasta donde el flujo del ion K^+ es relevante en los procesos de capacitación y RA en el espermatozoide, así como cuales son los canales de K^+ involucrados en este proceso. De este modo, mediante el uso de la técnica de "Patch Clamp" en la configuración de célula completa se inició una minuciosa investigación de los canales de K^+ presentes en las células espermatogénicas de ratón.

En el presente trabajo, además del canal previamente reportado por Hawigara y Kawa (1984), se lograron registrar dos tipos de canales nuevos de K^+ . En este sentido aquí se presenta por primera vez la caracterización de 2 diferentes canales de K^+ presentes en estas células. El canal rectificador tardío previamente reportado (Hagiwara y Kawa, 1984) se presentó en ~80 % de las células registradas y en una baja densidad (amplitudes de corriente de 30-200 pA/simplasto). La caracterización parcial de este canal muestra propiedades similares a las previamente descritas (figs. 13 y 14).

En cuanto a los canales nuevos: 1.- Un canal del tipo *Slo3* de alta expresión en algunas células (amplitud de corriente de 500 a 3000 pA/simplasto), se presentó sólo en ~12 % de los simplastos registrados (ver fig. 9). Los datos mostrados en esta tesis constituyen la primera evidencia experimental de la presencia de este tipo de corriente en las células espermatogénicas del ratón. 2.- El canal K_{ir} , también descrito por primera vez en este tipo de células y del cual discutiremos en detalle mas adelante.

CANAL DEL TIPO *Slo3*

De forma simultánea a nuestro trabajo, el grupo de Salkoff en 1998 clonó a partir de un banco de ADNc de testículo de ratón un canal de K^+ que nombraron *Slo3*. Este canal se caracterizó electrofisiológicamente en un sistema de expresión heterólogo, pero no lograron caracterizarlo directamente en las células de origen. Los resultados de su estudio en ovocito son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo para el canal del tipo *Slo3*. Pese a que se pueden realizar algunas especulaciones en relación con sus implicaciones fisiológicas, no existe aun evidencia directa alguna que permita definir con absoluta certeza el papel fisiológico de este canal. El hecho de que este canal sea pobremente selectivo para K^+ con respecto a Na^+ ($P_K/P_{Na}=5/1$), permite establecer que bajo condiciones iónicas fisiológicas ($[K^+]_e=5$ mM y $[K^+]_i=150$ mM (Espinosa, *et al.*, 1995)) el canal de tipo *Slo3* permitiría el flujo de una corriente iónica con un $E_{K_{rev}}$ de -45 mV. De esta manera si una fracción de estos canales estuviese parcialmente abierta podría influir significativamente en el establecimiento del E_m de reposo llevándolo cerca de este E_{rev} . El E_m del espermatozoide se estima es alrededor de -56 mV, el cual,

es relativamente positivo en comparación a otros tipos celulares que oscilan entre -70 y -100 mV. La presencia y apertura parcial durante el reposo de un canal *Slo3* en el espermatozoide podría explicar el valor del potencial de reposo de estas células. No obstante, se requiere de una mejor caracterización biofísica y farmacológica de este canal para tener herramientas que nos permitan establecer su papel fisiológico en el espermatozoide. Por ejemplo, una vez que se tenga un fármaco específico para el canal tipo *Slo3* podría determinarse *in vitro* la contribución de este canal en el E_m mediante el uso de colorantes fluorescentes sensibles a voltaje.

EL CANAL K_{ir}

La tercera corriente registrada en las células espermatogénicas del ratón corresponde a una del tipo transportada a través de canales del tipo K_{ir} , un rectificador entrante. Como se muestra en la sección de Resultados este canal es altamente selectivo para K^+ (figs. 16, 17, 20), susceptible al bloqueo por Ba^{2+} (IC_{50} 15.4 μM) (figs. 21, 22 y tabla 2) y modulado positivamente por incrementos de pH_i (fig. 25). Cuando se finalizaba la caracterización de este canal se publicó un reporte del grupo de Pessia y sus colaboradores (1999) en relación con la identificación de un canal K_{ir} en células espermatogénicas y espermatozoide de rata. Dichos autores identificaron a la subunidad αK_{ir} 5.1 mediante el uso de RT-PCR en las células espermatogénicas y mediante inmunofluorescencia en las células espermatogénicas y el espermatozoide maduro (Salvatore, *et al.*, 1999). Sin embargo, estos autores no pudieron registrar la actividad de este canal en las células de origen. La subunidad αK_{ir} 5.1 en sistemas de expresión

heteróloga, sólo puede dar una corriente funcional cuando se coexpresa como heterotetrámero con la subunidad 4.1. De estos datos, dichos autores concluyeron que el ARNm y la proteína del K_{ir} 5.1 está presente en las células espermatogénicas y en el espermatozoide, además de que probablemente la expresión funcional de esta subunidad α requiera de la asociación con otra subunidad α de los miembros de la familia K_{ir} . En su defecto, quizá el homotetrámero funcione por algún mecanismo de regulación que dependa de otra subunidad accesoria presente en el espermatozoide. De nuestros datos y los del grupo de Pessia es difícil poder establecer si la corriente que nosotros caracterizamos es producto de una subunidad α 5.1. Por un lado, tanto el heterotetrámero 4.1-5.1 como nuestro canal K_{ir} presentan mayor sensibilidad a Ba^{2+} que a Cs^+ , pero las cinéticas de activación son más lentas en el heterotetrámero que las registradas en el presente trabajo. No obstante, los ensayos sobre la dependencia al pH_i del heterotetrámero 4.1-5.1 ponen en evidencia que la subunidad α 5.1 confiere dicha sensibilidad al canal, ya que el homotetrámero de la subunidad α 4.1 es mucho menos dependiente del pH_i . Sin embargo, ya que existen evidencias de otras subunidades α de canales K_{ir} que son susceptibles a pH_i se abre la posibilidad de que la corriente registrada en las células espermatogénicas del ratón sea el producto de cualquiera de las otras subunidades que se sabe son sensibles a pH_i , o incluso una nueva. De este modo, resulta interesante buscar mediante estrategias experimentales de biología molecular cual o cuales son las subunidades α que son responsables de la corriente registrada en este trabajo.

IMPLICACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS CANALES *Slo3* Y K_{ir}

Los resultados de experimentos *in vitro* de capacitación y RA nos permitirán discutir una posible contribución fisiológica de los canales *Slo3* y K_{ir} durante el proceso de capacitación.

En el espermatozoide de los mamíferos se han caracterizado dos intercambiadores HCO_3^-/H^+ bicarbonato/protón farmacológicamente diferentes, que en condiciones de reposo mantienen niveles de pH_i bajos (6.4). Tal y como se mencionó con anterioridad, el potencial de membrana del espermatozoide está regulado principalmente por la relación de permeabilidad entre los canales *Slo3* y K_{ir} . Con el nivel de pH_i relativamente ácido en el reposo, resulta razonable proponer que la permeabilidad predominante al K^+ estaría dada a través de los canales *Slo3* por lo que el potencial tendería a -45 mV, en concentraciones fisiológicas de Na^+ y K^+ intra y extracelulares. Sin embargo, el potencial no tendría que ser igual a -45 mV pues la presencia de otros canales seguramente estarían influyendo, incluso el propio K_{ir} podría estar participando.

Antes de iniciar la capacitación, el K_{ir} presenta una baja probabilidad de apertura a pH_i de 6.4. No obstante, durante la capacitación el espermatozoide presenta una serie de cambios que incluyen incrementos en el pH_i (Zeng, *et al.*, 1996) que pueden conducir a un aumento en la probabilidad de apertura de los canales K_{ir} sensibles a pH_i (fig. 25 A y B) cambiando de este modo la relación de permeabilidad con respecto al *Slo3*. Considerando la alta selectividad del K_{ir} por K^+ , la apertura de estos canales llevaría al

E_m a valores cercanos al E_K (-96 mV). De este modo, el potencial se desplazaría a valores más negativos durante la capacitación como se ha reportado por Arnoult, (1996). Esta hiperpolarización está documentada extensamente en la literatura, sin embargo, no se conocía la entidad molecular responsable y como se regula. En este trabajo se pudo demostrar que dicha hiperpolarización es en gran parte causada por la apertura de los canales K_{ir} (ver fig. 27).

Nuestros resultados también mostraron que 300 μM Ba^{2+} Bloquea al canal K_{ir} previniendo la hiperpolarización generada durante la capacitación (fig. 27). De este modo se puede sugerir una implicación directa del canal K_{ir} en la hiperpolarización que ocurre durante la capacitación, también desde luego en función de su alta selectividad para K^+ (figs. 16, 17 y 20). Considerando el hecho de que el pH_i regula al canal, resulta razonable pensar entonces que el incremento de pH citoplásmico es un prerequisite para que la hiperpolarización se de durante la capacitación. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para corroborar o descartar esta propuesta.

PAPEL FISIOLÓGICO DE LA HIPERPOLARIZACIÓN DURANTE LA CAPACITACIÓN

La relevancia funcional de la hiperpolarización que ocurre durante la capacitación es motivo de amplias discusiones en diversos trabajos (Zeng, *et al.*, 1995; Visconti, *et al.*, 1995). La mayoría de dichos trabajos apuntan a que la depolarización remueve la inactivación de los canales de Ca^{2+} del tipo T dejándolos disponibles para que se abran.

Una de las características de estos canales es que a potenciales positivos entran en un estado inactivo a partir del cual no se pueden activar. La forma para quitar dicha inactivación es mediante una hiperpolarización previa a la depolarización que los abrirá (Lievano, *et al.*, 1996; Espinosa, *et al.*, 2000). En el caso del espermatozoide del mamífero, en el potencial de reposo menos del 20% de los canales de Ca^{2+} están disponibles para abrirse por depolarizaciones (Santi, *et al.*, 1996). Así, un potencial de reposo relativamente positivo asegura la inhabilitación de los canales de Ca^{2+} tipo T, por tanto, una baja permeabilidad de Ca^{2+} a través de estos en el reposo. Por el contrario, una hiperpolarización previa a la RA, como ocurre en la capacitación, habilita y deja disponibles a más del 90% de los canales tipo T para abrirse durante la RA. Cómo se modula la apertura de los canales de Ca^{2+} durante la RA, es un tema en el cual aun hay muchas preguntas por contestar. Existen datos que sugieren que el canal puede ser sujeto a modulación por fosforilación, albúmina y calmodulina (Arnoult, *et al.*, 1997; Espinosa, *et al.*, 2000; López-González, *et al.*, 2001). Estas observaciones podrían sugerir que la apertura de los canales de Ca^{2+} durante la RA no solo depende de la depolarización, sino que podría estar sujeta a otras vías de regulación. Sin embargo, los datos al momento son debatibles por lo que hay un arduo trabajo que realizar en este sentido.

El presente trabajo proporciona evidencia experimental que demuestra que la hiperpolarización es previa e indispensable a la RA y que probablemente se genera por

un incremento en la permeabilidad a K^+ a través de canales K_{ir} modulados positivamente por un aumento de pH_i que ocurren durante la capacitación (ver fig. 29).

SECUENCIA DE EVENTOS DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA RA

Con base en los resultados del presente trabajo, en la figura 29 se muestra un esquema de eventos que proponemos podrían ocurrir durante la capacitación y la RA. Además se sugiere cómo los canales K_{ir} podrían participar directamente en el proceso de la capacitación e influir sobre la RA. Esta figura muestra algunas de las moléculas involucradas en la capacitación y la RA, así como los pasos secuenciales que probablemente se dan durante estos procesos.

Al inicio de la capacitación se da un cambio en la actividad de los intercambiadores HCO_3^-/H^+ , así mediante la salida de H^+ se produce una alcalinización de la célula incrementando la apertura del canal K_{ir} . Al abrirse este canal se genera una salida del ion K^+ hacia el exterior de la célula y por consiguiente una hiperpolarización celular. Dicha hiperpolarización removería la inactivación de los canales T, dejándolos habilitados para abrirse por algún estímulo. Esta cascada de eventos se representa en el panel A de la figura 29 y se documenta con la figura superior de dicho panel, en la que se muestran los cambios de pH_i y E_m que se han reportados en la literatura (Zeng, *et al.*, 1996; Arnoult, *et al.*, 1996). El cambio de estos parámetros intracelulares se

normalizado al máximo efecto obtenido en la célula a los 120 min de iniciada la capacitación.

El panel B muestra la cascada de eventos que se lleva a cabo en el espermatozoide una vez que se ha capacitado y que es expuesto a ZP. Cuando el receptor de membrana de ZP entra en contacto con su ligando, el espermatozoide inicia la RA. Mediante una vía no bien establecida este receptor regula la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T, generando incrementos en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libres en el citoplasma. Dicha entrada de Ca^{2+} es indispensable para que la célula pueda desarrollar exocitosis acrosomal y poder penetrar la ZP y fecundar al óvulo. En la parte superior del panel B, se documenta la entrada de Ca^{2+} durante la RA mostrando un trazo en el que se mide $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en una sola célula, mediante un marcador fluorescente para este ion (O'Toole, *et al.*, 2000).

De esta forma, se puede sugerir que la presencia de un canal de K^+ como el K_{ir} en células espermatogénicas resulta de gran importancia para el espermatozoide durante los procesos de Capacitación y RA. Cambios en el potencial de membrana durante estos eventos son importantes y pueden estar modulados o influenciados significativamente por el flujo de K^+ a través de este tipo de canales.

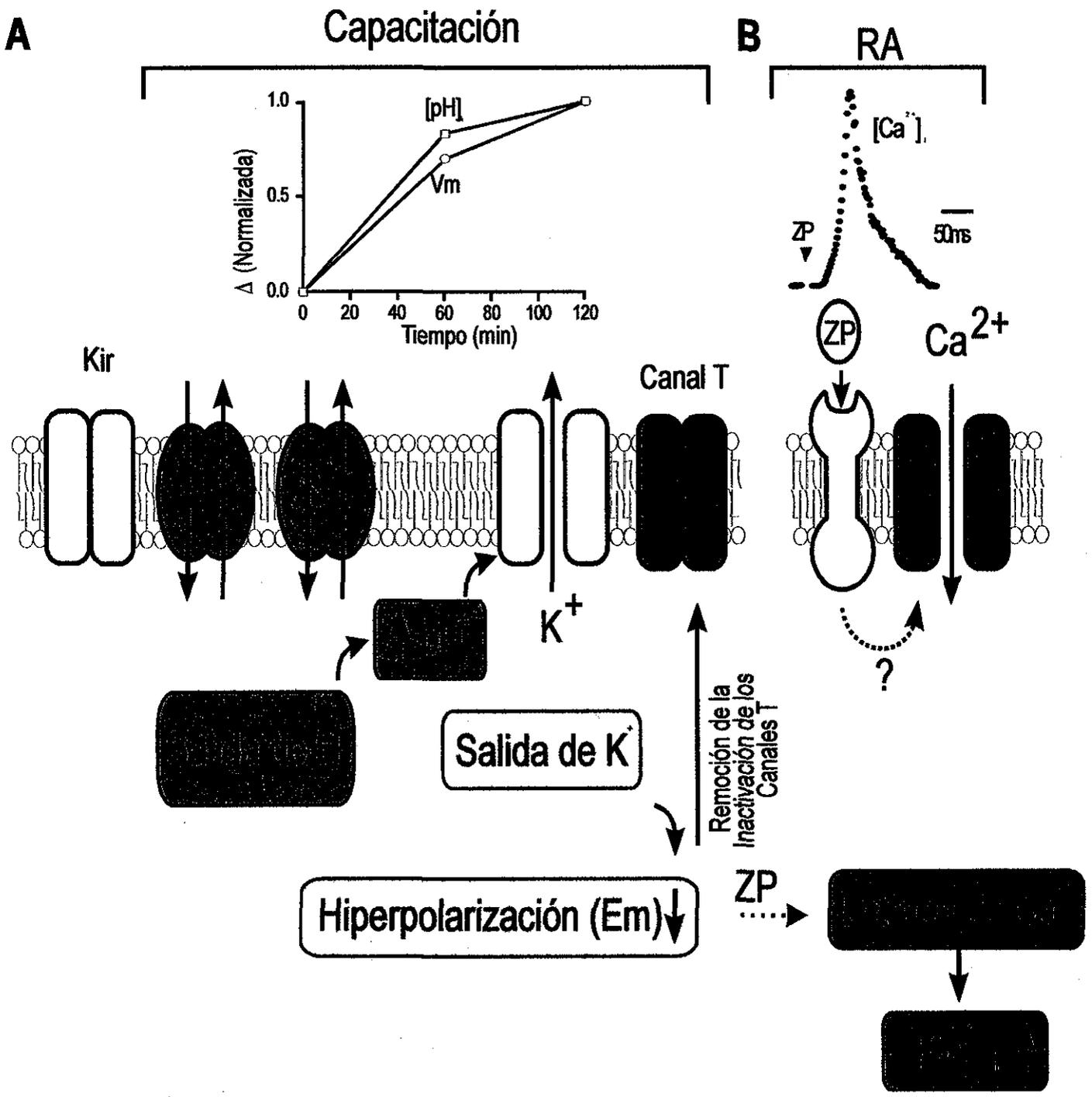


Figura 29. Modelo de la implicación funcional del canal K_{ir} modulado por pH_i durante la capacitación y la RA. A) Cascada de eventos que podrían darse durante la capacitación. B) Cambios de Ca²⁺ durante la RA, una vez se ha unido la ZP a su receptor en la membrana del espermatozoide.

VI

CONCLUSIONES

Como se mencionó en los antecedentes el espermatozoide debe pasar por un proceso de maduración llamado capacitación que lo habilita para llevar a cabo la reacción acrosomal (RA) y fecundar con éxito al óvulo. En ambos procesos existen cambios en los niveles de segundos mensajeros y en la regulación de los flujos iónicos. En la capacitación destaca una hiperpolarización del potencial de membrana (E_m) y un aumento en el pH intracelular (pH_i). En la RA por su parte, se da una entrada de Ca^{2+} rápida y transitoria, muy probablemente a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje del tipo T, seguida de una entrada de Ca^{2+} lenta y continua que probablemente se deba a una corriente a través de otro tipo de canales conocidos como canales operados por el vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC, por sus siglas en inglés) o también llamados simplemente canales capacitativos (O'Toole, *et al.*, 2000). De lo anterior es importante resaltar que la(s) entidad(es) molecular(es) que regula(n) la hiperpolarización durante la capacitación no se conocen, y que tampoco está claro el mecanismo por el cual la célula se depolariza durante la RA para abrir los canales de Ca^{2+} tipo T. Estos canales se encuentran en su mayoría en un estado inactivo al potencial de reposo de la célula y dependen de una hiperpolarización para poder salir de

ese estado refractario y pasar a un nuevo estado cerrado disponible para activarse en respuesta a la depolarización de la membrana.

En el presente trabajo se presentan evidencias experimentales de la presencia de un canal de K^+ rectificador entrante (K_{ir}), de alta selectividad al ion K^+ , y con baja probabilidad de apertura tanto a los niveles de pH_i en el reposo (~ 6.5). Durante la capacitación el pH_i se incrementa en ~ 0.2 unidades, lo cual puede aumentar significativamente la probabilidad de apertura del canal K_{ir} permitiendo la salida de K^+ en función de su gradiente electroquímico, dando como consecuencia una hiperpolarización dependiente de pH_i . Esta hiperpolarización sería suficiente para quitar la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T y dejarlos disponibles para abrirse en respuesta a una depolarización subsecuente. Durante la RA inducida por el agonista fisiológico (*zona pellucida*, ZP) se produce una depolarización suficientemente alta como para activar los canales de Ca^{2+} del tipo T. Esta depolarización podría darse por un cierre de los canales K_{ir} que ocasionaría que el potencial de membrana (que puede llegar a valores tan negativos como -80 mV durante la capacitación) tendiera al potencial de reposo, voltaje suficiente para activar una fracción importante de canales de Ca^{2+} . Una posibilidad alternativa, sería que la apertura de canales del tipo *Slo3* (poco selectivos a K^+ respecto a Na^+) podría llevar el potencial de membrana al potencial inversión de la corriente que se mueve a través de ellos (~ -45 mV), con la consecuente activación de los canales de Ca^{2+} .

De este modo se puede concluir que los canales del tipo $Sl\sigma 3$ y K_{ir} son piezas de suma importancia en la fisiología del espermatozoide. Ambos tipos de canales podrían contribuir de manera muy importante al establecimiento del E_m en estas células durante los diferentes estadios. La contribución de cada uno de ellos al potencial de membrana bajo ciertas condiciones fisiológicas podría determinar su participación en la hiperpolarización que acompaña el proceso de capacitación, y controlar así el comportamiento de los canales de Ca^{2+} cuya activación parece ser un requisito indispensable para el desarrollo de la RA. Además, existe la posibilidad de la participación de estos canales en otros procesos de maduración del espermatozoide como la espermatogénesis, así como en eventos posteriores en la fecundación como la fusión de los gametos.

VII

PERSPECTIVAS

- 1) Caracterizar con mayor detalle las propiedades biofísicas y farmacológicas de los dos nuevos tipos de canales de K^+ identificados en las células espermatogénicas del ratón. Esto permitirá definir la fisiología de cada uno de ellos en experimentos *in vitro* de capacitación y la RA.
- 2) Investigar los mecanismos de regulación de los canales de K^+ . Estudiando principalmente niveles de fosforilación y modulación por segundos mensajeros.
- 3) Determinar la(s) vía(s) de modulación de estos canales resulta de suma importancia. Esto permitirá ubicarlos en un contexto global en las cascadas de señalización que se llevan a cabo en el espermatozoide durante su tarea de fecundar al óvulo.
- 4) Identificar la naturaleza molecular de estos canales, mediante herramientas de biología molecular y bioquímicas como la inmunocitoquímica. Esto permitirá conocer acerca de la variabilidad de estas proteínas, así como de las diversas vías que pueden modular a estos canales.
- 5) Determinar la participación de estos canales en otros eventos fisiológicos. Fundamentalmente su contribución durante la espermatogénesis.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- AIDLEY, D.J. AND P.R. STANFIELD. 1996. *Ion Channels*, University Press, Cambridge, Great Britain.
- ALMERS, W. 1990. Exocytosis. *Annu.Rev.Physiol.* **52**: 607-624.
- ARMSTRONG, C.M. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J.Gen.Physiol.* **58**: 413-437.
- ARMSTRONG, C.M. 1974. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q.Rev.Biophys.* **7**: 179-210.
- ARNOULT, C., Y. ZENG, AND H.M. FLORMAN. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J.Cell Biol.* **134**: 637-645.
- ARNOULT, C., J.R. LEMOS, AND H.M. FLORMAN. 1997. Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **16**: 1593-1599.
- ARNOULT, C., I.G. KAZAM, P.E. VISCONTI, G.S. KOPF, M. VILLAZ, AND H.M. FLORMAN. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**: 6757-6762.
- BABCOCK, D.F. 1983. Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore. *J.Biol.Chem.* **258**: 6380-6389.
- BABCOCK, D.F., M.M. BOSMA, D.E. BATTAGLIA, AND A. DARSZON. 1992. Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 6001-6005.
- BENATAR, M. 2000. Neurological potassium channelopathies. *QJM* **93**: 787-797.
- BLEIL, J.D. AND P.M. WASSARMAN. 1980. 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.
- BOOKBINDER, L.H., A. CHENG, AND J.D. BLEIL. 1995. Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* **269**: 86-89.
- BRADY, S.T. 1991. Molecular motors in the nervous system. *Neuron* **7**: 521-533.
- BROWN, A.M. 1993. Functional bases for interpreting amino acid sequences of voltage-dependent K⁺ channels. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **22**: 173-198.
- CARBONE, E., E. WANKE, G. PRESTIPINO, L.D. POSSANI, AND A. MAELICKE. 1982. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* **296**: 90-91.

- CASTLE, N.A., D.G. HAYLETT, AND D.H. JENKINSON. 1989. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends.Neurosci.* **12**: 59-65.
- CATTERALL, W.A. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**: 50-61.
- CHA, A., G.E. SNYDER, P.R. SELVIN, AND F. BEZANILLA. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* **402**: 809-813.
- CHAN, H.C., T.S. ZHOU, W.O. FU, W.P. WANG, Y.L. SHI, AND P.Y. WONG. 1997. Cation and anion channels in rat and human spermatozoa. *Biochim.Biophys.Acta* **1323**: 117-129.
- CHAVEZ, R.A., A.T. GRAY, B.B. ZHAO, C.H. KINDLER, M.J. MAZUREK, Y. MEHTA, J.R. FORSAYETH, AND C.S. YOST. 1999. TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J.Biol.Chem.* **274**: 7887-7892.
- CHEN, Y., M.J. CANN, T.N. LITVIN, V. IOURGENKO, M.L. SINCLAIR, L.R. LEVIN, AND J. BUCK. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628.
- CHOE, H., L.G. PALMER, AND H. SACKIN. 1999. Structural determinants of gating in inward-rectifier K⁺ channels. *Biophys.J.* **76**: 1988-2003.
- CHRISTIE, M.J., R.A. NORTH, P.B. OSBORNE, J. DOUGLASS, AND J.P. ADELMAN. 1990. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* **4**: 405-411.
- COETZEE, W.A., Y. AMARILLO, J. CHIU, A. CHOW, D. LAU, T. MCCORMACK, H. MORENO, M.S. NADAL, A. OZAITA, D. POUNTNEY, M. SAGANICH, d.M. VEGA-SAENZ, AND B. RUDY. 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**: 233-285.
- COOK, S.P. AND D.F. BABCOCK. 1993. Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *J.Biol.Chem.* **268**: 22408-22413.
- COOK, S.P., C.J. BROKAW, C.H. MULLER, AND D.F. BABCOCK. 1994. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev.Biol.* **165**: 10-19.
- DARSZON, A., A. LIEVANO, AND C. BELTRAN. 1996. Ion channels: key elements in gamete signaling. *Curr.Top.Dev.Biol.* **34**: 117-167.
- DARSZON, A., P. LABARCA, T. NISHIGAKI, AND F. ESPINOSA. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol.Rev.* **79**: 481-510.
- DOLLY, J.O. AND D.N. PARCEJ. 1996. Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J.Bioenerg.Biomembr.* **28**: 231-253.
- DOYLE, D.A., C.J. MORAIS, R.A. PFUETZNER, A. KUO, J.M. GULBIS, S.L. COHEN, B.T. CHAIT, AND R. MACKINNON. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.

- DRAKOPOULOU, E., J. COTTON, H. VIRELIZIER, E. BERNARDI, A.R. SCHOOF, M. PARTISETI, D. CHOQUET, G. GURROLA, L.D. POSSANI, AND C. VITA. 1995. Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **213**: 901-907.
- EDDY, E.M. AND D. O'BRIEN. 1994. The spermatozoon. Pages 29-77 in KNOBIL E AND NEILL JD, Eds., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York.
- ESPINOSA, F. AND A. DARSZON. 1995. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. *FEBS Lett.* **372**: 119-125.
- ESPINOSA, F., I. LOPEZ-GONZALEZ, C.J. SERRANO, G. GASQUE, J.L. DE LA VEGA-BELTRAN, C.L. TREVINO, AND A. DARSZON. 1999. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca(2+) currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in Xenopus oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev.Genet.* **25**: 103-114.
- ESPINOSA, F., G. LÓPEZ, C. MUÑOZ-GARAY, R. FELIX, J.L. DE LA VEGA, G.S. KOPF, P.E. VISCONTI, AND A. DARSZON. 2000. Dual regulation of the T-type Ca(2+) current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* **475**: 251-256.
- FAKLER, B., C.T. BOND, J.P. ADELMAN, AND J.P. RUPPERSBERG. 1999. Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K⁺ channels from subunits of different subfamilies: Kir 2.1 (IRK1) and Kir 4.1 (BIR10). *Pflugers Arch.-Eur.J.Physiol.* **433**: 77-83.
- FESENKO, E.E., S.S. KOLESNIKOV, AND A.L. LYUBARSKY. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**: 310-313.
- FLORMAN, H.M. AND B.T. STOREY. 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev.Biol.* **91**: 121-130.
- FLORMAN, H.M. AND N.L. FIRST. 1988. 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.
- FLORMAN, H.M., M.E. CORRON, T.D. KIM, AND D.F. BABCOCK. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev.Biol.* **152**: 304-314.
- FLORMAN, H.M. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev.Biol.* **165**: 152-164.
- FLORMAN, H.M., C. ARNOULT, I.G. KAZAM, C. LI, AND C.M. O'TOOLE. 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.
- FRASER, L.R. AND K. MCINTYRE. 1989. Calcium channel antagonists modulate the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.* **86**: 223-233.

- FRASER, L.R. 1993. Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol.Reprod.Dev.* **36**: 368-376.
- FRASER, L.R. 1995. Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Hum.Reprod.* **10**: 22-30.
- GALINDO, B.E., C. BELTRAN, E.J.J. CRAGOE, AND A. DARSZON. 2000. Participation of a K(+) channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of stronglyloccentrotus purpuratus sea urchin sperm. *Dev.Biol.* **221**: 285-294.
- GAO, Z. AND D.L. GARBERS. 1998. Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J.Biol.Chem.* **273**: 3415-3421.
- GARCIA, M.A. AND S. MEIZEL. 1999. Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol.Reprod.Dev.* **52**: 189-195.
- GARCIA, M.L., A. GALVEZ, M. GARCIA-CALVO, V.F. KING, J. VAZQUEZ, AND G.J. KACZOROWSKI. 1991. Use of toxins to study potassium channels. *J.Bioenerg.Biomembr.* **23**: 615-646.
- GARCIA, M.L., M. HANNER, H.G. KNAUS, R. KOCH, W. SCHMALHOFER, R.S. SLAUGHTER, AND G.J. KACZOROWSKI. 1997. Pharmacology of potassium channels. *Adv.Pharmacol.* **39**: 425-471.
- GAUSS, R., R. SEIFERT, AND U.B. KAUPP. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**: 583-587.
- GILLAM, S., R. ALINE, V. WYLIE, C.J. INGLES, AND M. SMITH. 1979. RNA synthesis and RNA polymerase activities in germ cells of developing rainbow trout testis. *Biochim.Biophys.Acta* **565**: 275-292.
- GLASSNER, M., J. JONES, I. KLIGMAN, M.J. WOOLKALIS, G.L. GERTON, AND G.S. KOPF. 1991. Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev.Biol.* **146**: 438-450.
- GLAUNER, K.S., L.M. MANNUZZU, C.S. GANDHI, AND E.Y. ISACOFF. 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* **402**: 813-817.
- GONG, X., D.H. DUBOIS, D.J. MILLER, AND B.D. SHUR. 1995. Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* **269**: 1718-1721.
- GONZALEZ-MARTINEZ, M. AND A. DARSZON. 1987. A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* **218**: 247-250.
- GOODWIN, L.O., D.S. KARABINUS, R.G. PERGOLIZZI, AND S. BENOFF. 2000. L-type voltage-dependent calcium channel alpha-1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* **6**: 127-136.

- GRISSMER, S., A.N. NGUYEN, J. AIYAR, D.C. HANSON, R.J. MATHER, G.A. GUTMAN, M.J. KARMILOWICZ, D.D. AUPERIN, AND K.G. CHANDY. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol.Pharmacol.* **45**: 1227-1234.
- GURROLA, G.B. AND L.D. POSSANI. 1995. Structural and functional features of noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **37**: 527-535.
- HAGIWARA, S. AND K. KAWA. 1984. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J.Physiol.(Lond.)* **356**: 135-149.
- HAMILL, O.P., A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN, AND F.J. SIGWORTH. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**: 85-100.
- HARPER M.J.K. 1994. Gamete and Zygote Transport. Pages 123-187 in KNOBIL E AND NEILL JD, Eds., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York.
- HECHT, N.B. 1995. The making of a spermatozoon: a molecular perspective. *Dev.Genet.* **16**: 95-103.
- HILLE BERTIL. 1992. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 2 ed. Sinauer Associates inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- HINES, P. AND E. CULOTTA. 1998. The evolution of sex. *Science* **281**: 1979
- ISACOFF, E.Y., Y.N. JAN, AND L.Y. JAN. 1990. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**: 530-534.
- KETCHUM, K.A., W.J. JOINER, A.J. SELLERS, L.K. KACZMAREK, AND S.A. GOLDSTEIN. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**: 690-695.
- KRAPIVINSKY, G., L. KRAPIVINSKY, K. WICKMAN, AND D.E. CLAPHAM. 1995. G beta gamma binds directly to the G protein-gated K⁺ channel, IKACH. *J.Biol.Chem.* **270**: 29059-29062.
- LABARCA, P., O. ZAPATA, C. BELTRAN, AND A. DARSZON. 1995. Ion channels from the mouse sperm plasma membrane in planar lipid bilayers. *Zygote*. **3**: 199-206.
- LABARCA, P., C. SANTI, O. ZAPATA, E. MORALES, C. BELTR'AN, A. L'EVANO, AND A. DARSZON. 1996. A cAMP regulated K⁺-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev.Biol.* **174**: 271-280.
- LESAGE, F., E. GUILLEMARE, M. FINK, F. DUPRAT, M. LAZDUNSKI, G. ROMÉY, AND J. BARHANIN. 1996. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* **15**: 1004-1011.
- LIEVANO, A., J.A. SANCHEZ, AND A. DARSZON. 1985. Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Dev.Biol.* **112**:

- LIEVANO, A., J.A. SANCHEZ, AND A. DARSZON. 1985. Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Dev.Biol.* **112**: 253-257.
- LIEVANO, A., C.M. SANTI, C.J. SERRANO, C.L. TREVINO, A.R. BELLVE, A. HERNANDEZ-CRUZ, AND A. DARSZON. 1996. T-type Ca²⁺ channels and alpha 1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* **388**: 150-154.
- LIU, C., E.S. LITSCHER, S. MORTILLO, Y. SAKAI, R.A. KINLOCH, C.L. STEWART, AND P.M. WASSARMAN. 1996. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**: 5431-5436.
- LOPEZ, L.C. AND B.D. SHUR. 1987. Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J.Cell Biol.* **105**: 1663-1670.
- LOUKIN, S.H. AND Y. SAIMI. 1999. K(+)-dependent composite gating of the yeast K(+) channel, Tok1. *Biophys.J.* **77**: 3060-3070.
- LÓPEZ, G.I., J.L. DE LA VEGA, C.M. SANTI, H.M. FLORMAN, R. FELIX, AND A. DARSZON. 2001. Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca²⁺ currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev.Biol.* **Sometido**:
- LU, Q. AND B.D. SHUR. 1997. Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* **124**: 4121-4131.
- LU, T., Y.G. ZHU, AND J. YANG. 1999. Cytoplasmic amino and carboxyl domains form a wide intracellular vestibule in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**: 9926-9931.
- MACKINNON, R. AND C. MILLER. 1988. Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J.Gen.Physiol.* **91**: 335-349.
- MEDHURST, A.D., G. RENNIE, C.G. CHAPMAN, H. MEADOWS, M.D. DUCKWORTH, R.E. KELSELL, I.I. GLOGER, AND M.N. PANGALOS. 2001. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **86**: 101-114.
- MINOR, D.L.J., S.J. MASSELING, Y.N. JAN, AND L.Y. JAN. 1999. Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell* **96**: 879-891.
- MORTILLO, S. AND P.M. WASSARMAN. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* **113**: 141-149.
- NICHOLS, C.G. AND A.N. LOPATIN. 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu.Rev.Physiol.* **59**: 171-191.

- O'TOOLE, C.M., C. ARNOULT, A. DARSZON, R.A. STEINHARDT, AND H.M. FLORMAN. 2000. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol.Biol.Cell* **11**: 1571-1584.
- POSSANI, L.D., B. SELISKO, AND G. GURROLA. 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **15**: 15-40.
- POSSANI, L.D., E. MERINO, M. CORONA, F. BOLIVAR, AND B. BECERRIL. 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* **82**: 861-868.
- RICHARDSON, R.T., N. YAMASAKI, AND M.G. O'RAND. 1994. Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev.Biol.* **165**: 688-701.
- ROMERO, A., M.J. ROMAO, P.F. VARELA, I. KOLLN, J.M. DIAS, A.L. CARVALHO, L. SANZ, E. TOPFER-PETERSEN, AND J.J. CALVETE. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold [letter]. *Nat.Struct.Biol.* **4**: 783-788.
- RUDY, B. 1988. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**: 729-749.
- RUPPERSBERG, J.P., K.H. SCHROTER, B. SAKMANN, M. STOCKER, S. SEWING, AND O. PONGS. 1990. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* **345**: 535-537.
- SALKOFF, L., K. BAKER, A. BUTLER, M. COVARRUBIAS, M.D. PAK, AND A. WEI. 1992. An essential 'set' of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends.Neurosci.* **15**: 161-166.
- SALVATORE, L., M.C. D'ADAMO, R. POLISHCHUK, M. SALMONA, AND M. PESSIA. 1999. Localization and age-dependent expression of the inward rectifier K⁺ channel subunit Kir 5.1 in a mammalian reproductive system. *FEBS Lett.* **449**: 146-152.
- SANTI, C.M., A. DARSZON, AND A. HERNANDEZ-CRUZ. 1996. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca²⁺ current is the main Ca²⁺ current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am.J.Physiol.* **271**: C1583-C1593
- SANTI, C.M., T. SANTOS, A. HERNANDEZ-CRUZ, AND A. DARSZON. 1998. Properties of a novel pH-dependent Ca²⁺ permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J.Gen.Physiol.* **112**: 33-53.
- SCHREIBER, M., A. WEI, A. YUAN, J. GAUT, M. SAITO, AND L. SALKOFF. 1998. Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J.Biol.Chem.* **273**: 3509-3516.
- SEINO, S. 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel receptor assemblies. *Annu.Rev.Physiol.* **61**: 337-362.
- SERRANO, C.J., C.L. TREVINO, R. FELIX, AND A. DARSZON. 1999. Voltage-dependent Ca(2+) channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* **462**: 171-176.

- SINCLAIR, M.L., X.Y. WANG, M. MATTIA, M. CONTI, J. BUCK, D.J. WOLGEMUTH, AND L.R. LEVIN. 2000. Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol.Reprod.Dev.* **56**: 6-11.
- STANFIELD, P.R. 1983. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **97**: 1-67.
- STUHMER, W., J.P. RUPPERSBERG, K.H. SCHROTER, B. SAKMANN, M. STOCKER, K.P. GIESE, A. PERSCHKE, A. BAUMANN, AND O. PONGS. 1989. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* **8**: 3235-3244.
- SUESSBRICH, H. AND A.E. BUSCH. 1999. The IKs channel: coassembly of IsK (minK) and KvLQT1 proteins. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **137**: 191-226.
- TEMPEL, B.L., Y.N. JAN, AND L.Y. JAN. 1988. Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature* **332**: 837-839.
- TENGOWSKI, M.W., M.J. WASSLER, B.D. SHUR, AND G. SCHATTEN. 2001. Subcellular localization of beta1,4-galactosyltransferase on bull sperm and its function during sperm-egg interactions. *Mol.Reprod.Dev.* **58**: 236-244.
- VACQUIER, V.D. 1998. Evolution of gamete recognition proteins. *Science* **281**: 1995-1998.
- VISCONTI, P.E., J.L. BAILEY, G.D. MOORE, D. PAN, P. OLDS-CLARKE, AND G.S. KOPF. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**: 1129-1137.
- VISCONTI, P.E., G.D. MOORE, J.L. BAILEY, P. LECLERC, S.A. CONNORS, D. PAN, P. OLDS-CLARKE, AND G.S. KOPF. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**: 1139-1150.
- VISCONTI, P.E. AND G.S. KOPF. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol.Reprod.* **59**: 1-6.
- WALENSKY, L.D. AND S.H. SNYDER. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J.Cell Biol.* **130**: 857-869.
- WARD, C.R., B.T. STOREY, AND G.S. KOPF. 1994. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J.Biol.Chem.* **269**: 13254-13258.
- WASSARMAN, P.M. AND D. ALBERTINI. 1994. The Mammalian Ovum. Pages 79-122 in KNOBIL E AND NEILL JD, Eds., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York.
- WASSARMAN, P.M. 1999. Fertilization in animals. *Dev.Genet.* **25**: 83-86.
- WASSARMAN, P.M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* **96**: 175-183.

- WEI, A., T. JEGLA, AND L. SALKOFF. 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**: 805-829.
- WEISS, D.S. AND K.L. MAGLEBY. 1992. Voltage-dependent gating mechanism for single fast chloride channels from rat skeletal muscle. *J.Physiol.(Lond.)* **453**: 279-306.
- WESSEL, R., W.B.J. KRISTAN, AND D. KLEINFELD. 1999. Supralinear summation of synaptic inputs by an invertebrate neuron: dendritic gain is mediated by an "inward rectifier" K(+) current. *J.Neurosci.* **19**: 5875-5888.
- WEYAND, I., M. GODDE, S. FRINGS, J. WEINER, F. MULLER, W. ALTENHOFEN, H. HATT, AND U.B. KAUPP. 1994. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**: 859-863.
- WUETHRICH, B. 1998. Why sex? Putting theory to the test [news]. *Science* **281**: 1980-1982.
- YANAGIMACHI R. 1994. Mammalian Fertilization. Pages 189-317 in KNOBIL E AND NEILL JD, Eds., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York.
- YANG, Y. AND F.J. SIGWORTH. 1998. Single-channel properties of IKs potassium channels. *J.Gen.Physiol.* **112**: 665-678.
- ZENG, Y., E.N. CLARK, AND H.M. FLORMAN. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev.Biol.* **171**: 554-563.
- ZENG, Y., J.A. OBERDORF, AND H.M. FLORMAN. 1996. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev.Biol.* **173**: 510-520.

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amper
ABC	Grupo de proteínas con una secuencia consenso de unión a ATP
AC	Adenilato Ciclasa
ADNc	Ácido Desoxinucleico Complementario
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C ₉	Trietilamonio
CCCP	Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona
Cols	Colaboradores
CTX	Caribdotoxina
DE	Desviación estandar
DHP	Dihidropiridinas
DiSC ₃ (5)	3,3'-dipropiltiodicarbocianina, yoduro
DNA	Ácido Desoxinucleico
DTX	Dendrotoxina
EBPs	Proteínas de Unión al Huevo
EDTA	Etilendinitrilotetracetato Disódico
EGTA	Etilen Glicol- bis(□-Aminoetil Eter) N,N,N',N'-Ácido tetraacetico
E _{inv}	Potencial de Inversión
E _K	Potencial de Equilibrio del K ⁺
E _m	Potencial de Membrana
E _{Na}	Potencial de Inversión de Na ⁺
E _{rev}	Potencial Reverso de la Corriente
ES	Error Estandar
fig.	Figura
g	Conductancia
g	Gramo
GABA	Ácido γ-aminobutirico
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
h	Horas
HEPES	N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[Ácido 2-etanosulfonico]
HP	Potencial de Mantenimiento ("Holding Potential")
Hz	Hertz
I	Corriente Ampers

IC ₅₀	Concentración molar necesaria para producir la mitad del efecto
I _h	Corrientes hiperpolarizantes
IP ₃	Inositol-3,4,5-Trifosfato
K _d	Constante de afinidad
K _{ext}	K ⁺ Externo
l	litro
m	Metro
M	Molar
Min	Minutos
<i>n</i>	Numero de Muestras
NMDG	N-Metil-D-Glucamina
NTX	Noxiustoxina
°C	Grados Centígrados
Ω	Ohm
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
pH	Logaritmo negativo de la concentración de hidrógeno
pH _e	pH extracelular
pH _i	pH intracelular
P _K	Permeabilidad para K ⁺
P _{Na}	Permeabilidad para Na ⁺
Ptx	Pertusistoxina
RA	Reacción Acrosomal
rpm	Revoluciones por Minuto
RT-PCR	Transcripción Reversa Acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
s	Segundos
S	Siemen
SB	Solución del Baño
SOC	Canales operados por el vaciamiento de las reservas de Ca ²⁺ intracelulares
SP	Solución de la Pipeta
TEA ⁺	Tetraetilamonio
U	Unidades
V	Volts
V ^{1/2}	Voltaje al cual se tiene la mitad de la conductancia
Vol	Volumen
ZP	<i>Zona Pelucida</i>
τ _{act}	Constante de Tiempo de la Activación
τ _{bloq}	Constante de Tiempo del Bloqueo
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Ca ²⁺ Intracelular
[K ⁺] _e	Concentración de K ⁺ Externo
4-AP	4-Aminopiridina

ANGLISISMOS

Patch Clamp	Fijación de voltaje en microáreas de membrana
Inside-Out	El interior celular viendo hacia la solución del baño
Inside-In	El interior celular viendo hacia la solución de la pipeta
Whole-Cell	Célula Completa
Holding Potential	Potencial de Mantenimiento

LISTA DE FIGURAS

	Pg
1 Esquema de la espermatogénesis.	18
2 Estructuras generales del espermatozoide de mamífero.	20
3 Efecto de K^+ externo sobre la capacitación de espermatozoides de ratón.	23
4 Electromicrografía de barrido de un espermatozoide de hamster entrando en la ZP.	25
5 Modelo de la traducción de la señal inducida por la ZP3 en el espermatozoide del mamífero.	30
6 Modelo de la estructura de los canales de K^+ de 6 segmentos transmembranales modulados por voltaje.	36
7 Configuraciones de sellos de membrana utilizados en la fijación de voltaje.	50
8 Tinción diferencial con azul de Coomassie en espermatozoides reaccionados y no reaccionados.	54
9 Corriente de célula completa, tipo <i>Slo3</i> .	57
10 Efecto del K^+ externo sobre la corriente del tipo <i>Slo3</i> .	59
11 Protocolo de colas y potencial de inversión de la corriente del tipo <i>Slo3</i> .	61
12 Bloqueo de la corriente tipo <i>Slo3</i> por TEA^+ y 4AP.	63
13 Corriente de célula completa a través del canal rectificador tardío.	64
14 Efecto del TEA^+ sobre el canal rectificador tardío.	65
15 Corriente entrante de K^+ en células espermatogénicas de ratón.	67
16 Dependencia de la corriente al K^+ externo.	69
17 Relación corriente voltaje del canal K_{ir} para 3 diferentes concentraciones de K^+_{ext} .	71
18 Curva conductancia voltaje del canal K_{ir} .	72
19 Estimación de la $V_{1/2}$ para concentraciones fisiológicas de K^+ extracelular.	74
20 Permeabilidad del canal K_{ir} a Rb^+ y Na^+ .	76
21 Bloqueo del canal K_{ir} por Ba^{2+} y Rb^+ .	77
22 Curva Dosis-Respuesta del bloqueo por Ba^{2+} .	79
23 Bloqueo del canal K_{ir} por Cs^+ es dependiente del voltaje.	80
24 Participación del Mg^{2+} en la rectificación del canal K_{ir} .	82
25 Regulación del canal K_{ir} por pH_i .	84
26 Efecto de Ba^{2+} sobre la capacitación y la RA.	87
27 Efecto de Ba^{2+} sobre la hiperpolarización del E_m que ocurre durante la capacitación.	90
28 Especificidad de Ba^{2+} sobre el canal K_{ir} .	91
29 Modelo de la implicación funcional del canal K_{ir} modulado por pH_i durante la capacitación y la RA.	103

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

AN INTERNATIONAL JOURNAL PUBLISHED UNDER THE AUSPICES OF THE SOCIETY FOR DEVELOPMENTAL BIOLOGY

January 19, 2001

Dr. Alberto Darszon
Universidad Autónoma de México
Instituto de Biotecnología
Departamento de Genética y Fisiología Molecular
Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62250
MEXICO

Re: Ms. No. DBIO2000-0469RR
Title: Inwardly-Rectifying K⁺ Channels in Spermatogenic Cells:
Functional Expression and Implication in Sperm Capacitation

Dear Alberto:

I am pleased to inform you that your paper has now been accepted for publication in *Developmental Biology*. I am forwarding your manuscript on to Academic Press today and you will hear from them directly.

One note from the reviewer that I hope you will consider: he feels that the lines in Figs. 2-5 are much too thin. Could you please modify these figures and send final copies to Academic Press?

Thank you for submitting your interesting work to the journal.

Sincerely,



Laurinda Jaffe
Editor

cc: DB Editorial Office



Editor-in-Chief
N. OLSON
Department of Molecular
Biology and Oncology
University of Texas
Southwestern Medical
Center at Dallas
5900 Harry Hines Blvd.
Dallas, Texas 75235-9148
Phone (214) 648-1187
Fax (214) 648-1140

Section Editors
ANNE BRONNER-FRASER
H. DAVIDSON
J. FRASER
J. HARLAND
P. INGHAM
M. JAFFE
K. KRUMLAUF
M. MARTIN
R. RUVKUN
D. HEW P. SCOTT

Assistant Editor
M. WESSEL

Editorial Office
ACADEMIC PRESS
Harcourt Inc.
321 Street, Suite 1900
San Diego, California 92101-4495
Phone (619) 699-6342
Fax (619) 699-6700
Email db@acad.com
Website academicpress.com/db