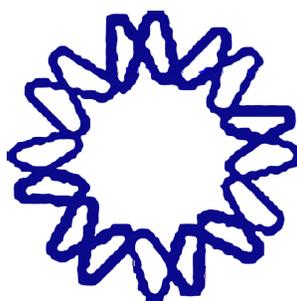




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA MOLECULAR



Estudio del canal de K^+ Slo3 y los canales de Ca^{2+} tipo T del espermatozoide y su posible participación en procesos espermáticos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Pablo Martínez López

Asesor de tesis: Dr. Alberto Darszon Israel.

Cuernavaca Mor. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alberto Darszon Israel a quien agradezco su continuo interés y sus consejos. La investigación se realizó en el departamento de genética y biología del desarrollo del instituto de biotecnología de la UNAM. Agradezco también el apoyo del CONACyT y la atmósfera de colaboración brindada por todos los miembros del laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia académica:

Al. Dr. Alberto Darszon por su dirección y apoyo,
gracias por su confianza y consejos.

Al. Dr. Gabriel Gasque y Al Dr. Juan José Acevedo por iniciarme en esta profesión y
darnos ejemplos de excelencia y fortaleza.

Al Dr. Takuya Nishigaki y a las Drs. Claudia Treviño y Carmen Beltrán por su apoyo y
consejos.

A Francisca Calendario, Maria de la Paz Colin, José Luís de la Vega Beltrán y Juan
Monroy por su amistad y apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. Lourival Domingos Possani, al Dr. Alberto Darszon, al Dr. Juan José Acevedo, al
Dr. Carlos Muñoz, y al Dr. Enrique A. Reynaud que formaron parte del honorable jurado.
Gracias por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Ignacio López y al Dr. Omar Pantoja por su asesoría como miembros del comité
tutoral.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

**A mis padres, por su amor y motivación. Gracias por obsequiarnos la libertad de
ser.**

A Gaby y Albina por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

ABREVIATURAS		
RESUMEN		5
I	Introducción	7
1.1	Canales iónicos y la fisiología del espermatozoide	8
1.2	Movilidad	9
1.3	Capacitación espermática	12
1.3.1	Cambios en la composición de la membrana durante la capacitación	13
1.3.2	Efecto de iones extracelulares sobre la capacitación	13
1.4	Reacción acrosomal en espermatozoides de mamífero	15
1.5	Los canales de K^+ de la familia Slo tienen propiedades únicas e interesantes.	18
1.5.1	El canal de K^+ Slo1	18
1.6	Relevancia del canal Slo3 en la fisiología del espermatozoide	20
1.6.1	Participación del canal Slo3 durante la capacitación	20
1.6.2	El canal Slo3 e infertilidad	21
1.7	Técnicas para estudiar los canales iónicos de espermatozoide	21
1.7.1	Indicadores fluorescentes	21
1.7.2	Electrofisiológicas	24
1.7.2.1	Bicapas planas	24
1.7.2.2	“patch-clamp inteligente”	24
1.7.2.3	Registros sobre la superficie celular (Espermatozoides hinchados)	27
1.7.2.4	Registros de célula completa (Células espermatógenicas)	27
1.7.5	Clonación molecular y expresión heteróloga	28
II	Hipótesis	28
III	Objetivos	28
3.1	Objetivo general	28
3.2	Objetivos específicos	28
IV	Materiales y Métodos	29
4.1	Obtención de espermatozoides de ratón	29
4.2	Registro electrofisiológico	30
4.3	Soluciones de registro	31
4.3.1	Soluciones para registrar la corriente de los canales Slo3, ENaCs y K_{ATP}	31
4.3.2	Soluciones para registrar corrientes de Ca^{2+}	31
4.4	Patch-clamp en la gota citoplásmica	31
V	Resultados	32
5.1	Contribución de diversos canales a la corriente macroscópica del espermatozoide	32
5.2	Caracterización de corrientes de K^+ (Slo3)	35
5.3	Análisis de la corriente instantánea en las corrientes espermáticas	43
5.4	Estudio del potencial de inversión (PI) de las corrientes espermáticas	45
5.5	Corrientes de Ca^{2+} de espermatozoides testiculares de ratón	46
VI	Discusión	49
6.1	Posible papel fisiológico del canal Slo3	52
6.2	Inhibición de canales de Ca^{2+} tipo T	53
VII	Conclusiones	54
7.1	Presencia del canal Slo3 en espermatozoide	54
7.2	Corrientes de Ca^{2+} tipo T en el espermatozoide testicular de ratón	55

VIII	Perspectivas	56
8.1	Perspectivas para demostrar la participación de Slo3 en capacitación y/o RA.	56
8.2	Perspectivas en la caracterización de canales de Ca²⁺ tipo T	57
IX	Referencias	58

ABREVIATURAS

AMPc adenosin monofosfato cíclico	mOsm miliosmoles
[AMPc]_i concentración intracelular de AMPc	ms milisegundos
[Ca²⁺]_i concentración intracelular de calcio.	mV milivolts
CCDV canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	nA nanoamperios
CE células espermatoogénicas	nM nanomolar
DHPs dihidropiridinas	nm nanómetros
DS desviación estándar de la media	pA picoamperios
Em potencial de membrana	Patch-clamp fijación de voltaje en microáreas de membrana
HEPES ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[2-etanosulfónico])	pHi pH intracelular
IBMX 3-Isobutyl-1-methylxanthine	PI potencial de inversión
PM potencial de mantenimiento	PKA cinasa de proteína A
HVA alto umbral de activación	PTX toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
ICa_T corriente de Ca ²⁺ tipo T	RA reacción acrosomal
InsP3R (IP3R) receptor de inositol trifosfato	s segundos
IP3 inositol trifosfato	SOCs canales operados por el vaciamiento de pozas internas
[IP3]_i concentración intracelular de IP3	TEA tetraetil amonio
kHz kiloHertz	t tiempo
LED Light emitting diode	TRP o trp , transient receptor potential (proteínas o gen respectivamente)
LVA bajo umbral de activación	V_m potencial de prueba
M molar	ZP zona pelúcida
mg miligramos	μM micromolar
ml mililitros	

RESUMEN:

Para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo, es fundamental la participación de canales iónicos. Por lo tanto es de gran interés estudiar la función y regulación de los canales iónicos presentes en el espermatozoide. Sin embargo, la mayoría de las especies animales tienen espermatozoides demasiado pequeños y rígidos como para ser estudiados fácilmente por medio de técnicas electrofisiológicas convencionales como es el “patch-clamp”. En este proyecto se usa una técnica que consiste en registrar la corriente total del espermatozoide haciendo uso de la “gota citoplásmica” sobre la cual se realiza el sello de alta resistencia eléctrica. Se ha demostrado que a pesar de ser una estructura residual que será eliminada, la gota citoplásmica está en continuidad eléctrica con el espermatozoide completo, por lo que con esta técnica se pueden obtener corrientes macroscópicas en la configuración de célula completa.

En este trabajo se identificó la presencia en espermatozoide de ratón del canal epitelial de Na^+ (ENaC) así como de un canal de K^+ rectificador entrante regulado por ATP (K_{ATP}) mediante el uso de los inhibidores amilorida y tolbutamida, respectivamente. Además, se realizó la detección en el espermatozoide de canales de Ca^{2+} tipo T funcionales y se probó que estas corrientes espermáticas generadas por los canales de Ca^{2+} tipo T son importantes para la reacción acrosomal y se inhiben por mibefradil y nifedipina. Por otra parte, se estudió el canal Slo3, reportado y clonado por primera vez por Salkoff en 1998, descrito como un miembro de la familia de canales de K^+ Slo y de expresión preferencial en el espermatozoide. En el presente trabajo, se registró y caracterizó por primera vez de forma endógena. La expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, en el trabajo original de Salkoff y colaboradores, mostró que el Slo3 se activa por voltaje y alcalinización intracelular. Dado que durante la fecundación el

espermatozoide desarrolla cambios de potencial de membrana así como cambios en el pH intracelular (pHi), este canal podría participar de forma importante durante la fecundación. Por lo tanto, se determinó la presencia funcional de Slo3 en el espermatozoide de ratón estudiando su regulación por pHi, voltaje, nucleótidos cíclicos así como su selectividad iónica.

I. Introducción

El estudio de la fecundación ha experimentado algunos éxitos que han proporcionado tecnologías útiles en la solución de problemas de fecundación. Muchas parejas anteriormente infértiles ahora pueden tener hijos gracias a tratamientos como la fecundación *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). De lo anterior es claro que la investigación sobre la fecundación está generando y definiendo puntos clave que influyen sobre los valores y la salud de los humanos. Actualmente una gran parte de la investigación en biología molecular se dirige al conocimiento de cómo la información contenida en dos mitades de un genoma se integra para generar un nuevo miembro de la especie genéticamente único.

La fecundación en los mamíferos inicia con el movimiento de los gametos a través del tracto reproductor masculino y femenino hasta que se encuentran en el tracto genital femenino. La posterior interacción entre los dos gametos requiere varios pasos que resultan en la fusión de los gametos (Gilbert *et al.*, 1994).

El estudio del óvulo y del espermatozoide, es intenso tanto en el área molecular como en la electrofisiológica. Sin embargo, en investigación, ambas células presentan retos que sortear debido a su naturaleza. Por ejemplo, los óvulos de humano pese a su relevancia son difíciles de obtener, por lo que se estudian poco. Por otra parte, la mayoría de las especies animales tiene espermatozoides demasiado pequeños y rígidos como para ser estudiados fácilmente por medio de técnicas electrofisiológicas como es el “patch-clamp”.

Lo anterior ha limitado el estudio directo de los canales iónicos presentes en el espermatozoide, y a pesar de que el flujo de iones a través de las membranas celulares

tiene un papel fundamental en su fisiología, como en todas las células, en espermatozoides no se ha podido estudiar los canales iónicos espermáticos en conjunto.

Recientemente se eliminó la barrera limitante para obtener registros de corrientes macroscópicas de espermatozoides inmaduros gracias a la observación del grupo del Dr. Clapham. Este grupo logró registrar corrientes macroscópicas en espermatozoides inmaduros de epidídimo de ratón gracias a que obtuvieron sellos de alta resistencia en la gota citoplásmica (Kirichok *et al.*, 2006). La gota citoplásmica es una estructura vesicular que se encuentra en ~ 95% de los espermatozoides testiculares y puede encontrarse en la población de espermatozoides eyaculados en ~ 2%. Esta nueva estrategia amplía las posibilidades para estudiar directamente las corrientes macroscópicas en el espermatozoide. Como se observa en la figura 1, la gota citoplásmica se encuentra en espermatozoides tanto testiculares como del epidídimo. Un aspecto discutido de esta técnica es si existe continuidad eléctrica entre la gota citoplásmica y el resto del espermatozoide. Para resolver esta cuestión, el grupo del Dr. Clapham realizó un experimento en el cual la pipeta para hacer el patch-clamp contenía el colorante fluorescente naranja lucifer. Al establecer la configuración de célula completa, este colorante difundió a todo el espermatozoide desde la gota citoplásmica en un tiempo $< 5s$, probando que existe continuidad citoplasmática entre la gota y el espermatozoide, por lo que también existe continuidad eléctrica, lo cual hace factible realizar registros de corrientes macroscópicas generadas por canales iónicos que se encuentran distribuidos en todo el espermatozoide.

1.1 Canales iónicos y la fisiología del espermatozoide

La fecundación es un proceso complejo que para llegar a término requiere que el espermatozoide desarrolle procesos determinados que lo habilitan para fecundar al óvulo. Los procesos de la fecundación que metodológicamente pueden ser claramente definidos son: cambios en la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA). En estos eventos ocurre un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que depende del Ca^{2+} externo.

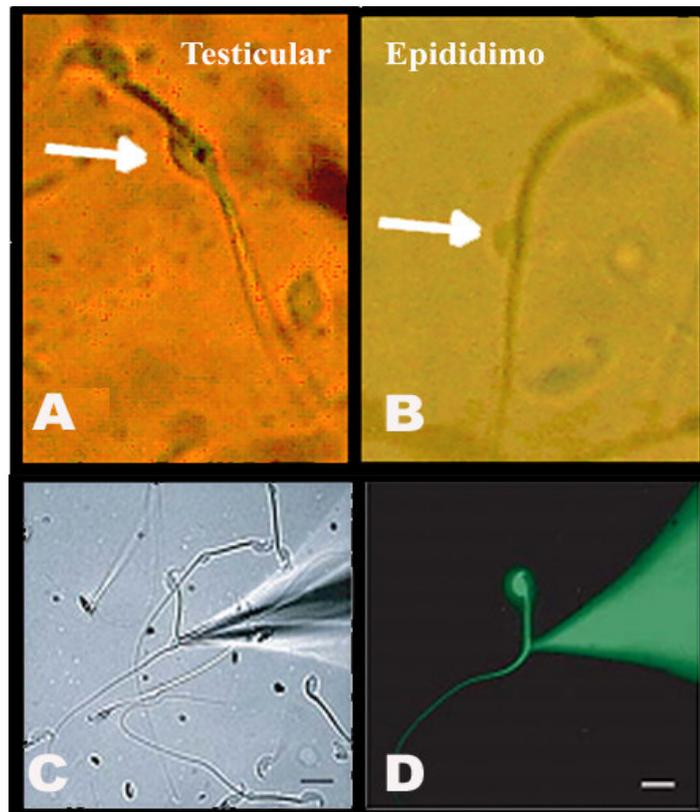


Fig.1: Gota citoplásmica en espermatozoides de ratón. **A.** Gota citoplásmica en espermatozoide obtenido de la dispersión de testículos de ratón de más de 3 meses de edad. **B.** Gota citoplásmica en espermatozoide de epidídimo de ratón (flecha en blanco). Se observa que esta tiene menor tamaño que la gota citoplásmica de espermatozoides de testículo. **C.** Patch-clamp en la gota citoplásmica de espermatozoide de epidídimo. **D.** El colorante (naranja Lucifer) en el interior de la pipeta difunde a todo el espermatozoide desde la gota citoplásmica en un tiempo < 5 s. (Imágenes C y D, tomadas de Kirichok *et al.*, 2006).

1.2 Movilidad

Una prueba inicial de que los canales iónicos regulan la movilidad se generó al observar que la composición del medio externo tiene efectos sobre la movilidad. Los espermatozoides de algunas especies al estar en el testículo se mantienen en estado inmóvil principalmente por una alta concentración extracelular de K^+ ($[K^+]_e$) (Darszon *et al.*, 2005).

Los espermatozoides de mamífero muestran dos formas de movilidad, el estado activado y el hiperactivado. La movilidad activada muestra un movimiento flagelar de baja amplitud que lo empuja a través del tracto genital femenino. Este movimiento flagelar es estimulado por fosforilación de proteínas flagelares en residuos de Ser, Tyr y Thr (Turner 2006), se han identificado pocas proteínas que son objeto de esta fosforilación, una de estas proteínas es la dineína del axonema, y al parecer, parece ser un punto de regulación en el inicio de la movilidad (Tash 1989). La cascada de fosforilación es regulada en parte por la acción del AMPc, sobre cinasas de proteínas como la PKA, la cual puede activarse por estimulación de la adenilato ciclasa soluble (ACs), el HCO_3^- y la $[Ca^{2+}]_i$ (Litvin *et al.*, 2003).

La movilidad hiperactivada se caracteriza por movimientos de gran amplitud que hacen que en medios de baja viscosidad el espermatozoide nade en una particular “forma de 8”. En medios de alta viscosidad la trayectoria es más progresiva. La movilidad hiperactivada es importante para el desplazamiento del espermatozoide a través del medio de alta viscosidad de los oviductos.

El Ca^{2+} extracelular es requerido para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada regulando directamente componentes de la maquinaria del axonema. En espermatozoides hiperactivados de hámster se registraron incrementos transitorios en la

[Ca²⁺]_i donde se observó correlación temporal de estas oscilaciones con la frecuencia flagelar (Suárez *et al.* 1993).

En espermatozoides de mamífero se han detectado diversas subunidades α de canales de Ca²⁺ (Cav). Las subunidades Cav1.2, 2.1 y 2.3 se localizaron en la pieza proximal del flagelo de ratón (Westen-broek and Babcock 1999), al igual que la subunidad auxiliar β 3 (Serrano *et al.* 1999).

Dada la dependencia a Ca²⁺ externo de la movilidad hiperactivada se sabe ahora que los incrementos transitorios de Ca²⁺ son generados por canales iónicos selectivos para Ca²⁺ posiblemente tipo L como Cav1.2, P/Q (Cav2.1) y R (Cav2.3) (William *et al.*, 2005).

Otros canales posiblemente involucrados en la movilidad son los pertenecientes a la familia de canales modulados por nucleótidos cíclicos (CNG). Estos canales se localizaron inmunológicamente a lo largo del flagelo (CNGA3) o confinados a la pieza principal (CNGB1) de espermatozoide de bovino (Wiesner *et al.*, 1998). Sin embargo el ratón nulo para el canal CNGA3 es fértil (Turner 2006). Posteriormente se han localizado miembros de la familia de canales TRP en el flagelo de espermatozoides de humano (TRPC1, C3 y C6) y ratón (TRPC1, C3, C4 y C6). Los inhibidores de canales TRP bloquean la movilidad activada de espermatozoides de humano (Castellano *et al.*, 2003).

Otra prueba contundente de la importancia de los canales iónicos en la movilidad corresponde al descubrimiento de una nueva clase de canales de Ca²⁺, cuya expresión esta confinada al testículo. Esta familia consta de cuatro miembros y se han descrito dos de ellos, Catspers 1 y 2 que se localizan en el flagelo (Quill *et al.*, 2001). El ratón nulo para Catsper 1 es infértil ya que sus espermatozoides son incapaces de hiperactivarse.

(Ren *et al.*, 2001). Los espermatozoides de estos ratones mutantes también muestran defectos en la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización y $[\text{AMPc}]_i$ (Carlson *et al.*, 2003).

Los registros de corrientes macroscópicas haciendo sellos en la gota citoplásmica de espermatozoides revelaron una corriente de Ca^{2+} constitutivamente activa y ligeramente dependiente de voltaje que es fuertemente potenciada por alcalinización intracelular (Kirichok *et al.*, 2006). Esta corriente esta ausente en los espermatozoides del ratón nulo para CatSper. La alcalinización y despolarización inducida simultáneamente con K^+ extracelular y adición de NH_4Cl generan una elevación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sensible a Ni^{2+} . Este canal dependiente de voltaje puede contribuir al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ocurre durante la capacitación (Fraire-zamora and González-Martínez 2004) y posiblemente durante la hiperactivación.

1.3 Capacitación espermática

Tanto el tracto genital masculino como el femenino, que el espermatozoide debe recorrer para poder fecundar al óvulo, presentan a esta célula diferentes condiciones extracelulares que modifican su fisiología. Así, Los espermatozoides almacenados en los testículos son inmóviles e incapaces de fecundar. Hasta que alcanzan el epidídimo es cuando adquieren la movilidad progresiva. Pero los espermatozoides de mamífero no son capaces de fecundar al óvulo inmediatamente después de ser eyaculados. Estos adquieren la capacidad de fecundar después de residir en el tracto genital femenino por un periodo de tiempo. A este proceso se le llama capacitación (Yanagimachi *et al.*; 1994). Como resultado de la capacitación se alteran muchos procesos bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide, algunas de estas modificaciones incluyen: cambios en la composición de la membrana, alcalinización intracelular, hiperpolarización de la

membrana plasmática, incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y activación de PKAs y cinasas de tirosina. Todos estos cambios hacen que el espermatozoide sea capaz de sufrir la reacción acrosomal (RA) y que desarrolle un patrón distinto de movilidad conocido como hiperactivación. La capacitación se puede producir *in vitro* incubando espermatozoides eyaculados en un medio que contiene glucosa, albúmina sérica (AS), $NaHCO_3^-$ y Ca^{2+} . Esta incubación es un prerrequisito para la fecundación *in vitro*.

1.3.1 Cambios en la composición de la membrana durante la capacitación

Durante la capacitación, la membrana plasmática se vuelve mas fluida debido a una reducción en la relación colesterol/fosfolipidos que resulta de la salida de colesterol de la membrana. La salida de colesterol de la membrana es inducida por una proteína receptora que se encuentra en el tracto genital femenino, la albúmina. Esta proteína se usa en la capacitación *in vitro* para retirar colesterol de la membrana (Gamzu *et al.*, 1997 y Cross 1998). En espermatozoides de humano existe también un reordenamiento de las balsas lipídicas (Cross 2004). Estos cambios en la composición lipidica, alteran las propiedades biofísicas de la membrana plasmática del espermatozoide, y pueden tener efectos directos o indirectos sobre las propiedades funcionales de varias proteínas de membrana como los canales iónicos y/o la actividad de diversas enzimas. Específicamente se cree que el cambio en la fluidez de la membrana tiene efecto sobre canales de K^+ (Gasque *et al* 2005).

1.3.2 Efecto de iones extracelulares sobre la capacitación

La capacitación *in vitro* requiere de al menos tres componentes: Ca^{2+} , HCO_3^- y AS. Se han reportado varios tipos de canales iónicos y transportadores presentes en el espermatozoide, pero aun no es claro como es que estos regulan el potencial de

membrana (E_m), el pH_i y la $[Ca^{2+}]_i$ durante la capacitación. Los espermatozoides no capacitados mantienen un E_m entre -35 a -45 mV que se hiperpolariza durante la capacitación (-80 mV) (Muñoz Garay *et al.*, 2001). Se ha propuesto que esta hiperpolarización quita la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) tipo T y los lleva del estado inactivo al estado cerrado a partir del cual se pueden abrir por acción indirecta de la ZP3 durante la RA. La identidad del transporte iónico responsable del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la capacitación no se conoce bien.

Ya que la $[K^+]_e$ así como bloqueadores de canales de K^+ (como el tetraetilamonio $[TEA^+]$) influyen la hiperpolarización que acompaña a la capacitación en espermatozoides de ratón, posiblemente la permeabilidad a K^+ contribuye a este proceso (Acevedo *et al.*, 2006). La evidencia molecular y funcional en espermatozoides y células espermáticas indica la presencia de canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de K^+ activados por Ca^{2+} y canales de K^+ del tipo rectificador entrante (Kir). También se ha detectado la nueva familia de canales de K^+ Slo o canales BK, que son dependientes de voltaje y modulados por factores intracelulares como pH_i , AMPc y $[Ca^{2+}]_i$. El único miembro de esta familia que se expresa sólo en espermátocitos es el recientemente descrito canal Slo3.

Antes de la capacitación, el pH_i del espermatozoide es relativamente ácido y puede inhibir a los canales Kir, condición que mantiene despolarizado el E_m e inhibe indirectamente la entrada de Ca^{2+} y por lo tanto la RA (Zeng *et al.*, 1996). Se mostró que un cotransportador de Na^+/HCO_3^- hiperpolariza el E_m del espermatozoide de ratón

después del incremento en la $[\text{HCO}_3^-]$ que ocurre durante la eyaculación (Demarco *et al.*, 2003).

Recientemente se mostró que el espermatozoide se hiperpolariza cuando se reemplaza el Na^+ externo por N-metil-glucamina. El reestablecer el Na^+ externo despolariza el Em por un proceso que puede ser inhibido por amilorida, o uno de sus derivados más potente, el 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida hidrocloreuro (Hernández-González *et al.*, 2006). Estos experimentos indican que en condiciones de reposo existe un transportador de Na^+ electrogénico que puede contribuir al potencial de mantenimiento del espermatozoide. Los canales de Na^+ epiteliales (ENaCs) son canales sensibles a amilorida que contribuyen al potencial de membrana (Em) desplazándolo hacia el potencial de equilibrio del Na^+ . Recientemente se reportó la presencia de canales ENaCs (subunidad α y β) en espermatozoides de ratón y de humano (Hernández-González *et al.*, 2006). La actividad de estos canales puede explicar el estado despolarizado de los espermatozoides no capacitados. Posiblemente los canales ENaCs están activados constitutivamente en espermatozoides no capacitados y se cierran durante la capacitación, contribuyendo así a la hiperpolarización que en el espermatozoide de ratón acompaña a la capacitación.

En conclusión, los datos indican que al menos dos diferentes canales y un cotransportador participan en la regulación del Em en el espermatozoide de ratón y quizá en el espermatozoide de humano.

1.4 Reacción acrosomal en espermatozoides de mamífero

Todos los espermatozoides que tienen un acrosoma deben desarrollar la RA para poder fecundar. Esta reacción exocítica, posibilita al espermatozoide para reconocer al óvulo, penetrar sus capas externas y fusionarse con su membrana plasmática. Componentes de las capas externas del óvulo activan este proceso fundamental que se modula por factores del tracto genital femenino en la fecundación interna.

El principal inductor fisiológico de la RA en mamíferos es la capa externa del óvulo conocida como zona pelúcida (ZP), constituida principalmente de tres proteínas (ZP1, ZP2 y ZP3). De los diversos componentes de la ZP, la proteína ZP3 es reconocida como el inductor natural de la RA. No se conoce con certeza el receptor en el espermatozoide de la ZP3 aunque existen varios candidatos (Jovine *et al.*, 2005). El modelo actual propone que el enlace de ZP3 a su receptor genera una respuesta de Ca^{2+} bifásica que implica al menos tres canales: canales de Ca^{2+} tipo T (CCDV), receptores de IP_3 (IP_3R) y canales tipo TRP. En este modelo se sugiere que la activación de los canales tipo T modula a los IP_3Rs y a los canales TRP (Stambouliau *et al.*, 2004).

En espermatozoides de ratón, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inicialmente se eleva a nivel micromolar en un lapso de 50 ms y regresa a su concentración inicial en aproximadamente 200 ms, la farmacología y cinética de estos cambios son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} tipo T (Cav3) (Arnoult *et al.*, 1999). Sumado a esto, varios antagonistas de los canales Cav3 como son las dihidropiridinas (DHPs) y Ni^{2+} inhiben la RA. Estos descubrimientos se han derivado principalmente de experimentos usando colorantes fluorescentes sensibles a Ca^{2+} . Estas observaciones indican que los canales de Ca^{2+} tipo T pueden participar en la RA del espermatozoide de ratón. Sin embargo, al potencial de reposo del espermatozoide de ratón (~ -45 mV), los canales tipo T se encuentran

inactivados. Para remover la inactivación de los canales tipo T se deben someter a potenciales más hiperpolarizados. Al activarse los canales de K⁺ tipo Kirs y cerrarse los canales de Na⁺ ENaCs durante la capacitación, ocurre una hiperpolarización que contribuiría a remover la inactivación de los canales de Ca²⁺ tipo T, habilitándolos para abrirse en una posterior despolarización, lo cual induciría un aumento en la [Ca²⁺]_i (Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Félix *et al.*, 2002; Acevedo *et al.*, 2006).

Los canales de Ca²⁺ tipo T comprenden tres isoformas (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3), estas isoformas se han detectado inmunológicamente en espermatozoides de ratón y de humano (Figura 2). Por experimentos con ratones nulos para Cav3.1 se sabe que esta isoforma no constituye el componente mayoritario de las corrientes T de las células espermatogénicas (Stamboulian *et al.*, 2004). Las subunidades Cav3.1 y Cav3.2 muestran marcadas diferencias en las sensibilidades a amilorida y a Ni²⁺. La IC₅₀ para el Ni²⁺ es de 12 μM para Cav3.2 y de 250 μM para Cav3.1 ambos expresados en células HEK (Lee *et al.*, 1999). Para amilorida, la IC₅₀ es de 167 μM para Cav3.2 (Williams *et al.*, 1999) y de valores cercanos a 5 μM para Cav3.1 clonado en células HEK (Lacinova *et al.*, 2000). Estas diferencias en la sensibilidad a amilorida y Ni²⁺ entre Cav3.1 y Cav3.2 han permitido conocer que la subunidad Cav3.2 es el componente mayoritario que conforma la entrada transitoria de Ca²⁺ (Trevino *et al.*, 2004).

La regulación de las corrientes T de las células espermatogénicas de ratón por proteínas G no ha sido demostrada (Arnoult *et al.*, 1997). Tampoco se ha probado que la PKA tenga efecto sobre las corrientes de Ca²⁺. Los inhibidores de fosfatasa de tirosina bloquean la facilitación voltaje dependiente de las corrientes tipo T de células espermatogénicas y disminuyen la corriente basal (Arnoult *et al.*, 1997).

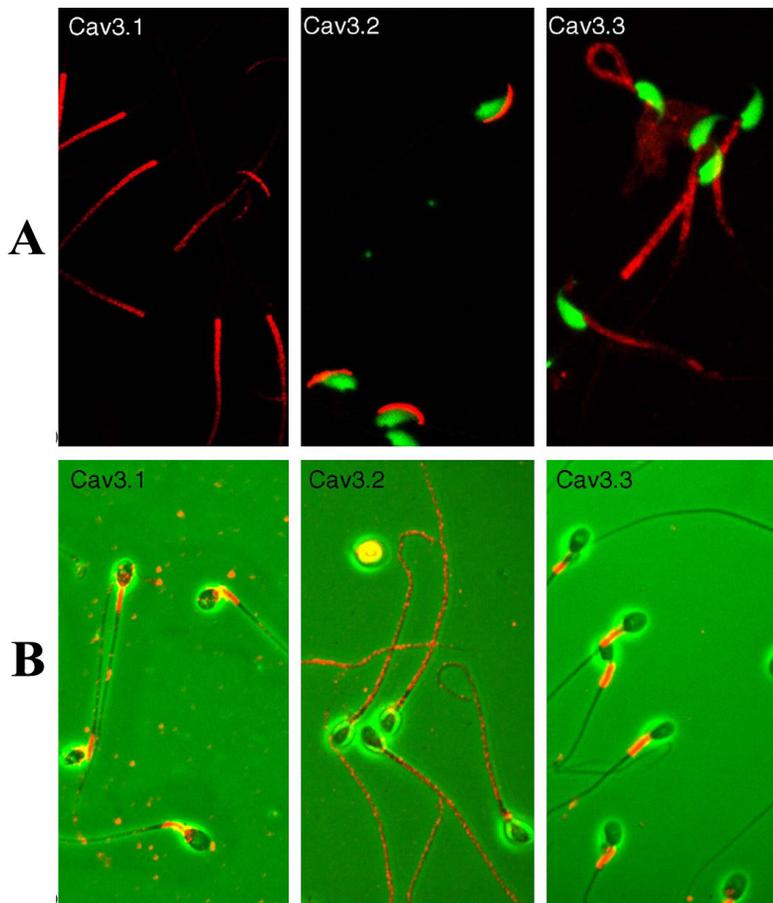


Figura 2: Detección inmunológica de canales de Ca^{2+} tipo T. **A.** Micrografía confocal de fluorescencia donde los espermatozoides de ratón son teñidos con anticuerpos específicos para cada una de las subunidades Cav3 (rojo). La subunidad Cav3.1 se localiza en la pieza principal del flagelo y en áreas cercanas al acrosoma. La subunidad Cav3.2 se expresa exclusivamente en la región acrosomal. Cav3.3 se encontró en la pieza media flagelar. **B.** Superposición del contraste de fases y de fluorescencia (rojo) de espermatozoides de humano marcados con anticuerpos contra las subunidades Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3. Cav3.1 se localiza en la cabeza y la pieza media

flagelar, Cav3.2 en todo el flagelo y Cav3.3 se expresa exclusivamente en la pieza media (Tomado de Darszon *et al.*, 2006).

1.5 Los canales de K^+ de la familia Slo tienen propiedades únicas e interesantes

De la mayoría de los canales de K^+ dependientes de voltaje, los canales de gran conductancia a K^+ (Slo tipo BK) son únicos en el sentido de que son regulados por dos señales fisiológicas: el Em y el Ca^{2+} citosólico (Barret *et al.*, 1982). El mecanismo general de la regulación por voltaje del Slo1 es compartido con los canales de K^+ dependientes de voltaje (Cui and Aldrich 2000). Este se basa principalmente en residuos cargados dentro del segmento transmembranal S4 de cada subunidad α . En contraste, existe controversia sobre el sitio y el mecanismo que confiere la regulación por $[Ca^{2+}]_i$. Muchos estudios sugieren que la estructura regulatoria del C-terminal es fundamental

(Schreiber *et al.*, 1999; Magleby, 2003), mientras que un estudio sugiere que la parte formadora de poro del canal es suficiente para conferir la activación dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Piskorowski and Aldrich, 2002).

Para resolver este conflicto se intercambiaron los módulos citosólicos entre Slo1 y Slo3, y se mostró que el dominio citosólico de Slo1 confiere fuerte regulación por Ca^{2+} en el módulo formador de poro de Slo3 (Único miembro de la familia Slo insensible a Ca^{2+}). La explicación de este resultado es que la especificidad al ligando en la familia de canales Slo esta definida por los módulos citosólicos del canal (Xiao-Ming *et al.*, 2004).

1.5.1 El canal del K^+ Slo1

Estudios inmunológicos recientes realizados en el laboratorio por la Dra. Claudia Treviño han mostrado la inmunolocalización del canal Slo1 en espermatozoides de ratón (datos no publicados). El canal de K^+ de gran conductancia Slo1 es activado sinérgicamente por $[Ca^{2+}]_i$, pero a diferencia del canal Slo3, Slo1 se expresa en diversos tejidos y su modulación por $[Ca^{2+}]_i$ esta ampliamente estudiada. Por ejemplo, el canal Slo1 es crucial para controlar la señalización neuronal acoplado su actividad al Em y a la $[Ca^{2+}]_i$ (Magleby *et al.*, 2003).

El último miembro de la familia Slo es el Slo3, clonado directamente de una librería de DNAc de testículo de ratón que exhibe una combinación única de dependencia de voltaje, sensibilidad a pH (Schreiber *et al.*, 1997) y modulación por nucleótidos cíclicos (Santi C. comunicación personal). Slo3 se expresa abundantemente en espermatozoides de mamífero, tiene una conductancia aproximada de 90 pS y muestra una marcada rectificación saliente. Esta expresión única y abundante en espermatozoides es interesante, ya que esta expresión específica podría tener alta relevancia en el desarrollo

a espermatozoides y la fisiología de estas células. Otra propiedad que destaca del canal Slo3 es su baja selectividad a K^+ sobre Na^+ siendo de 5 aproximadamente, en comparación con >50 para mSlo1. Esta propiedad se relaciona con diferencias en la secuencia de aminoácidos entre estos dos canales. Todos los canales con alta selectividad a K^+ tienen una secuencia consenso GYG en la región del poro (Yool and Shwartz 1991). En cambio, el canal mSlo3 tiene una secuencia GFG que muy probablemente afecta la selectividad. La baja selectividad del canal mSlo3 puede implicarlo en múltiples funciones dependiendo del medio extracelular que el espermatozoide encuentra en su camino hacia el óvulo. Por ejemplo, en un medio con alta concentración de Na^+ o K^+ , la activación de mSlo3 puede tener un efecto depolarizante o si estos iones se encuentran en bajas concentraciones, el resultado sería en dirección hiperpolarizante.

Ya que la descripción del canal de K^+ Slo3 es reciente, no se conocen inhibidores específicos. (Schreiber *et al.*, 1997). Se ha probado que la aplicación de Ba^{2+} 1 mM bloquea al 80% a la corriente de Slo3 en expresión heteróloga (Santi C. Comunicación personal), y que en células espermáticas la adición de 0.5 mM de TEA permite bloquear completamente a Slo1 mientras que Slo3 permanece activo al 80%.

Inmunológicamente se ha detectado la presencia del canal Slo3 en espermatozoides de ratón, ubicándolo en la pieza principal del flagelo (figura 3).

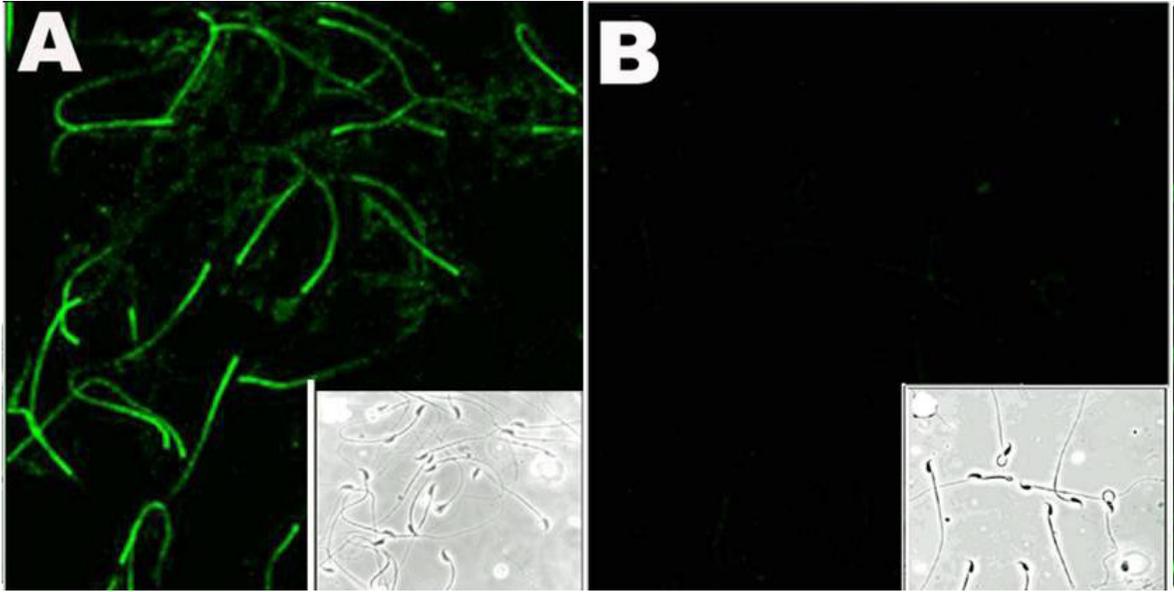


Figura 3: Identificación inmunológica del canal Slo3 en espermatozoide de ratón.
A. El canal Slo3 se localizó principalmente en la pieza media del flagelo. Se utilizó el anticuerpo Santi 3A a una concentración de 1:100 preparado por Celia Santi. **B.** El anticuerpo compite con el péptido, por lo que es específico para el canal Slo3.

1.6 Relevancia del canal Slo3 en la fisiología del espermatozoide

1.6.1 Participación del canal Slo3 durante la capacitación

Conociendo la relación de permeabilidad de Slo3 ($K^+/Na^+ \sim 5$) y las concentraciones iónicas en el medio capacitante, se estima que el potencial reverso de la corriente a través de este canal sería de ~ -35 mV. Este valor es cercano al valor promedio del Em de los espermatozoides no capacitados, por lo tanto es poco probable que Slo3 contribuyera a la hiperpolarización asociada a este proceso. Sin embargo los cambios que ocurren durante la capacitación como son el incremento en pHi y la activación de PKA y las cinasas de tirosinas podrían preparar al canal Slo3 para ser activado durante la RA.

1.6.2 El canal Slo3 e infertilidad

Aunque la disfunción espermática es una de las principales causas de infertilidad, se conoce poco sobre los procesos celulares, moleculares y genéticos que la ocasionan. Dentro de este grupo, los defectos en la RA son un factor común que origina esta patología. Varios estudios han mostrado que la incapacidad para producir una entrada de Ca^{2+} durante la RA esta asociada a una baja probabilidad de éxito en la fecundación *in vitro* (IVF) (Krauss *et al.*, 1995). La incapacidad para generar una entrada de Ca^{2+} puede ser el resultado de varios factores, uno de ellos es que el espermatozoide no pueda generar una despolarización adecuada durante la RA en respuesta a la ZP. El canal Slo3 puede participar en la despolarización inducida por ZP. Por lo tanto, es probable que algunas patologías en deficiencia para desarrollar RA pueden estar asociadas a la deficiencia en la apertura de los canales Slo3, limitándose la hiperpolarización y en consecuencia la remoción de la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo T.

La expresión específica de Slo3 en el espermatozoide, lo hace un atractivo blanco farmacológico (por ejemplo, en el diseño de anticonceptivos masculinos sin efectos secundarios, esto podría realizarse mediante el diseño o búsqueda de toxinas o inhibidores específicos para Slo3), por lo que comprender la función de Slo3 puede proporcionar datos importantes para futuras investigaciones en busca de bloqueadores específicos.

1.7 Técnicas para estudiar los canales iónicos de espermatozoide

1.7.1 Indicadores fluorescentes

La adquisición de imágenes de células vivas mediante técnicas de fluorescencia es una de las estrategias más importantes para estudiar respuestas celulares en tiempo real. Los

indicadores fluorescentes se pueden usar para medir *in vivo* la $[Ca^{2+}]_i$, el pH_i y el Em. En términos muy generales, estos colorantes cambian sus características de fluorescencia al unirse al ión para el cual son detectores o bien, al cambiar el potencial eléctrico (Zhang *et al.*, 2003). Actualmente, para medir concentraciones de Ca^{2+} se usan los indicadores fluorescentes como fura-2 y fluo-3, así como indicadores de fluorescencia por transferencia de energía resonante (FRET), que también son usados para medir parámetros biológicos como niveles de AMPc y muchos otros metabolitos (Shaner *et al.*, 2005).

Muy recientemente (agosto de 2006) se inició el uso estroboscópico de LEDs (Light emitting diode) como fuente de excitación para los fluoróforos, para estudiar la relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y la forma del movimiento flagelar en el espermatozoide de erizo de mar. El flagelo tiene una frecuencia de movimiento aproximada de 40 Hz, por lo que el uso de luz estroboscópica hace posible capturar imágenes claras del espermatozoide en movimiento. Además, el uso de LEDs estroboscópicos disminuye la fototoxicidad y la atenuación de la señal (photobleaching) (Nishigaki *et al.*, 2006). Sumado a estas ventajas, los LEDs tienen un consumo de energía muy bajo y poca generación de calor (Figura 4).

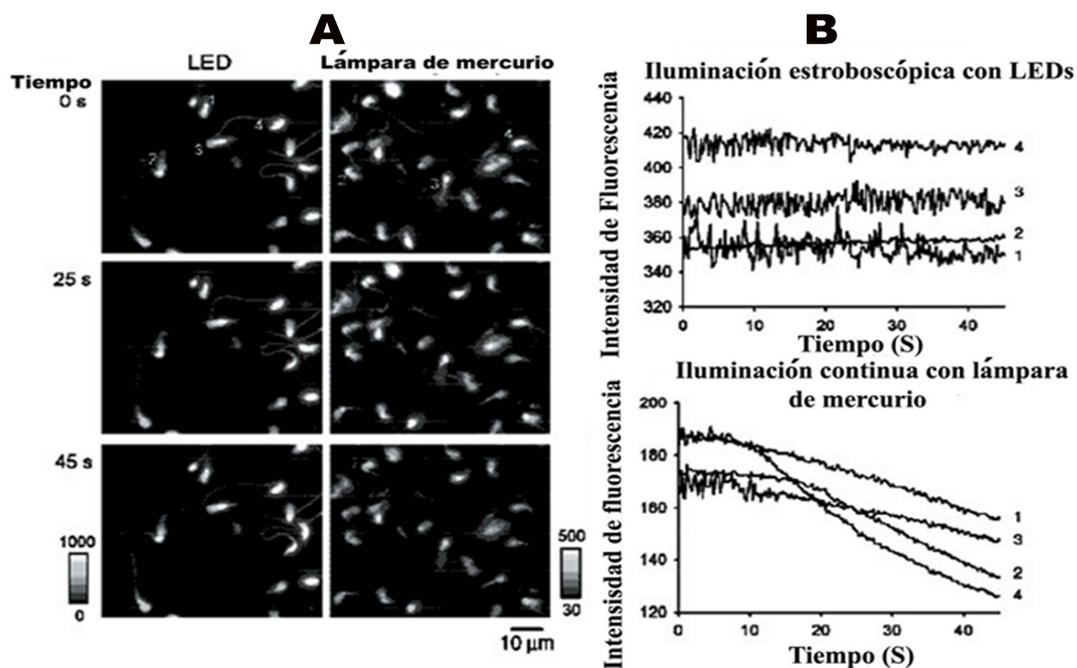


Figura 4: El sistema de iluminación estroboscópica con LEDs evita la pérdida de fluorescencia. A. Medición de pH en espermatozoides humanos comparando el método de iluminación estroboscópica con LEDs y el método de iluminación continua con lámpara de mercurio. **B.** Se muestra también la cinética del cambio en la fluorescencia entre los dos sistemas (tomado de Nishigaki *et al.*, 2006),

1.7.2 Electrofisiológicas

1.7.2.1 Bicapas planas

La disponibilidad de grandes cantidades de espermatozoides permite el aislamiento y caracterización de fracciones de membrana plasmática de diferentes regiones de la célula. Las vesículas de membrana plasmática se pueden reensamblar en diferentes sistemas modelo para estudiar los canales iónicos espermáticos. Uno de estos sistemas se conoce como “bicapas planas”. El primer registro de canales iónicos de espermatozoide de erizo de mar se realizó en la punta de una pipeta de patch clamp que contenía una monocapa generada a partir de una mezcla de vesículas lipídicas y membranas aisladas del flagelo de espermatozoide de erizo de mar (Lievano *et al.*, 1985). La fusión de vesículas de membrana plasmática aislada de espermatozoide a membranas de lípidos ha revelado la presencia de varios tipos de canales iónicos (revisado en Darszon *et al.*, 1999, 2005). La transferencia de canales iónicos de un espermatozoide vivo a bicapas planas de lípidos se ha logrado obteniendo corrientes de canal unitario. Sin embargo, no se ha determinado el mecanismo por el cual ocurre esta transferencia de canales iónicos a las bicapas (Beltrán *et al.*, 1994). En este procedimiento se agregan espermatozoides o vesículas de membrana plasmática de espermatozoide a uno de los lados de la bicapa lipídica. Se sabe que un gradiente osmótico entre ambos lados de la membrana lipídica favorece la fusión de vesículas y la transferencia de canales iónicos espermáticos.

1.7.2.2 “patch-clamp inteligente”

Como se comentó, el registro de los canales iónicos directamente en el espermatozoide se ha dificultado por su tamaño tan pequeño. El “patch-clamp inteligente” (smart patch

clamp), soluciona este problema ya que utiliza estrategias muy novedosas que permiten registrar con éxito canales presentes en el espermatozoide. Esta estrategia combina la microscopía de barrido de conductancia iónica (SICM por sus siglas en inglés) con registros de patch-clamp a través de una sola nanopipeta de vidrio. El electrodo de patch-clamp puede coleccionar información topográfica de la superficie celular con mayor resolución espacial que el microscopio óptico. Esta información le permite al experimentador realizar registros de canal unitario en células muy pequeñas o en estructuras celulares de fracciones de micra que son inaccesibles con los métodos convencionales (Gorelik *et al.*, 2002). El instrumento utiliza un microscopio óptico invertido con un mecanismo para coordinar las imágenes ópticas y de barrido a través de una cámara de video y una computadora. La posición de la punta de la pipeta con respecto a la superficie de la célula influye y determina la corriente que pasa a través de la pipeta esto significa que la resistencia del electrodo cambia en relación a la topografía de la superficie celular, esta provee la señal de retroalimentación para controlar la posición vertical de la punta y por ende su distancia con respecto a la superficie (Korchev *et al.*, 2000). Este ciclo de retroalimentación permite al controlador del SICM barrer la superficie celular manteniendo siempre una equidistancia entre ella y la punta de la pipeta y generar una imagen del relieve de la membrana celular en base al cambio en la resistencia del electrodo que ocurre al aproximarse a la célula (Figura 5), en base a la imagen así obtenida se puede seleccionar una estructura celular de interés. Desafortunadamente, esta estrategia no permite hacer registros de célula completa para documentar corrientes macroscópicas. Mediante la aplicación de esta técnica se ha registrado únicamente el canal Catsper, que se expresa mayoritariamente en testículo y espermatocitos.

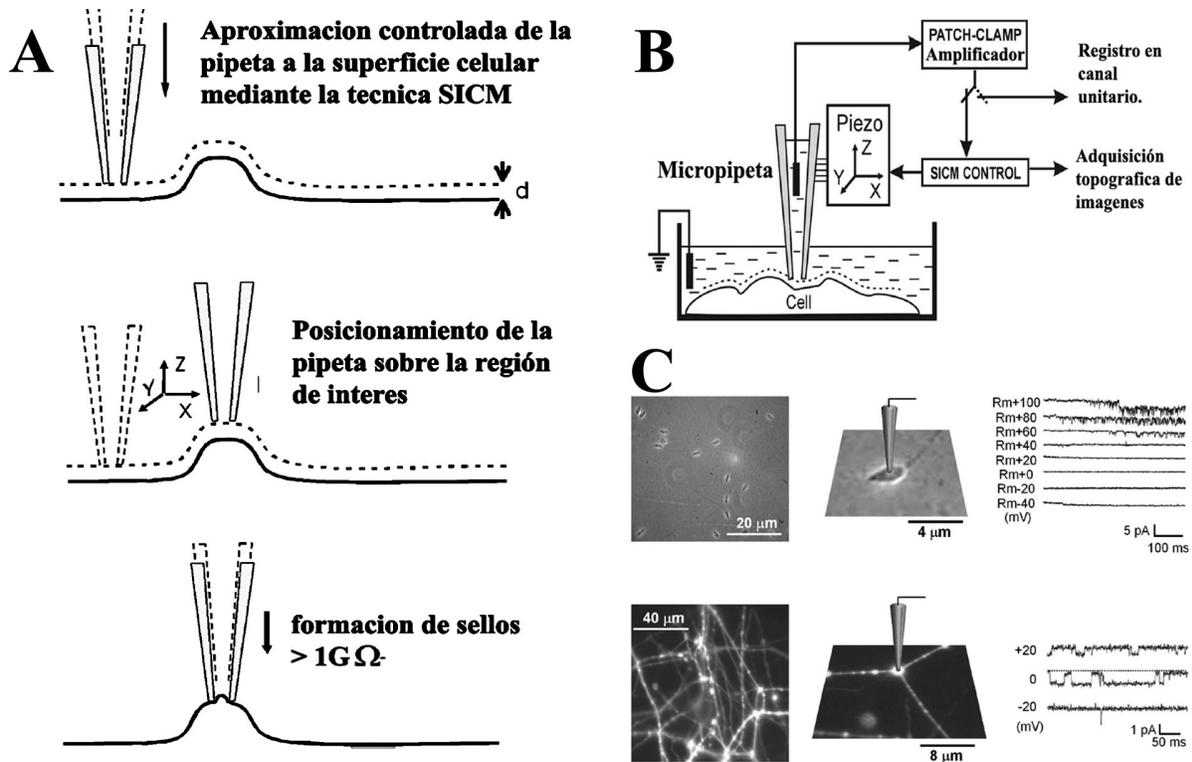


Figura 5: Smart Patch-clamp **A.** Principio de operación del monitoreo por conductancia iónica. La micropipeta se aproxima a la superficie celular a una distancia establecida, esta distancia se mantiene mientras se recorre la superficie celular para encontrar el área de interés, una vez que se localiza el lugar de estudio se hace descender la pipeta para formar un sello de alta resistencia. **B.** Diagrama del circuito de retroalimentación que controla el movimiento del micromanipulador sobre el cual esta montada la micropipeta. **C.** registro de corrientes de canal unitario en la cabeza de un espermatozoide (arriba) y el soma de una neurona (Gorelik *et al.*, 2002).

1.7.2.3 Registros sobre la superficie celular (Espermatozoides hinchados)

Para resolver la limitación de tamaño, los espermatozoides de erizo de mar se han hinchado en agua de mar diluida. Los espermatozoides hinchados son esféricos (4 micras de diámetro aproximadamente) y se les puede aplicar la técnica de fijación de voltaje. El hinchamiento de los espermatozoides de *S. purpuratus* mejora la probabilidad de éxito en los sellos de 1% a más del 20% (Babcock *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 2001).

1.7.2.4 Registros de célula completa (Células espermatogénicas)

Además de que los espermatozoides son muy pequeños como para estudiarlos electrofisiológicamente, son células terminales diferenciadas que hasta hace muy poco se pensaba eran incapaces de sintetizar proteínas (Gur y Breitbart, 2006). Así, la expresión genética y el ensamblado de proteínas se pueden estudiar en sus progenitoras: las células espermatogénicas. La espermatogénesis es un proceso en el que la espermatogonia se divide produciendo espermatocitos, los cuales se diferencian y maduran en espermatozoides (Austin *et al.*, 1972, Bellve *et al.*, 1977). Los espermatocitos en paquiteno así como las espermátidas, son los últimos estados de diferenciación y son traduccionalmente activos y mucho más grandes que los espermatozoides por lo que son fáciles de usar en patch clamp (Arnoult *et al.*, 1996, Arnoult *et al.*, 1997). Estas características hacen a las células espermatogénicas buenos modelos para estudiar canales iónicos, la presencia de los canales iónicos así identificados debe ser confirmada por estudios de inmunolocalización en el espermatozoide maduro. Ya que es posible que algunos canales iónicos de células

espermatogénicas participen en la espermatogénesis y no en el proceso de fecundación directamente.

1.7.5 Clonación molecular y expresión heteróloga

Muchos canales iónicos se han secuenciado y estudiado al expresarlos en sistemas heterólogos (Hille *et al.*, 1992). Ahora las bibliotecas moleculares se han explorado con sondas diseñadas para canales y receptores específicos. Es interesante que se encontraran miembros de la familia de genes de receptores olfatorios en células espermatogénicas y espermatozoides maduros (Vanderhaeghen *et al.*, 1993). Se han clonado y expresado heterológamente solo unos cuantos canales presentes en el espermatozoide (revisado en Darszon *et al.*, 2006).

II HIPÓTESIS

El canal Slo3 contribuye a las corrientes macroscópicas del espermatozoide testicular de ratón.

III Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar las corrientes de K^+ generadas por Slo3 y las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje directamente en el espermatozoide de ratón.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar sellos de alta resistencia en la gota citoplásmica de espermatozoide de ratón obtenidos de testículo para caracterizar en conjunto los canales iónicos presentes en la membrana del espermatozoide.
- 2) Evitar la contribución de los canales ENaCs y de los canales Kir en las corrientes macroscópicas del espermatozoide mediante la aplicación de los inhibidores Amilorida y Tolbutamida, respectivamente.
- 3) Determinar el grado de contribución del canal Slo3 en la corriente de K^+ del espermatozoide.
- 4) Registrar las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje del espermatozoide y realizar experimentos que determinen si estas corresponden a las corrientes de Ca^{2+} tipo T (Cav3). Se utilizará la farmacología conocida para la familia de canales CaV empleando 10 μ M de nifedipina y 10 μ M de mibefradil.

IV Materiales y Métodos

4.1 Obtención de espermatozoides de ratón

Los espermatozoides de ratón se obtuvieron a partir de los testículos de ratón de la cepa CD-1 adulto, de 3 a 4 meses de edad. Para la preparación de los espermatozoides, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les quitaron ambos testículos. Los testículos se colocaron en una solución salina con la siguiente composición (solución externa para registro de corrientes de Ca^{2+}): (en mM) NaCl, 130; KCl, 3; MgCl_2 , 2; NaHCO_3 , 1; NaH_2PO_4 , 0.5; HEPES-Na, 5; Glucosa, 10; CaCl_2 , 10 ajustada a pH 7.4 con NaOH. Posteriormente se cortó la túnica albugínea, la cual es una membrana que recubre los túbulos seminíferos.

Se usó disociación mecánica en lugar de disociación por digestión enzimática para evitar que la digestión con tripsina y colagenasa pudieran modificar alguna proteína de membrana del espermatozoide. La disociación mecánica consistió en la separación de los túbulos seminíferos utilizando pinzas de disección bajo un microscopio estereoscópico. Por último los espermatozoides se obtuvieron de los túbulos seminíferos por presión hidráulica con ayuda de una pipeta pasteur. Los espermatozoides y células espermátogénicas se mantuvieron a 4°C y se usaron el mismo día de la extracción.

4.2 Registro electrofisiológico

El uso de la técnica de patch-clamp (en fijación de voltaje) permite mantener constante el E_m , al mismo tiempo que se puede registrar la corriente generada por el flujo de iones a través de los canales iónicos en estado abierto. En este trabajo todos los registros se hicieron en la configuración de célula completa (whole-cell patch-clamp). Esta configuración consiste en colocar una pipeta sobre la membrana celular y, mediante una ligera succión, establecer un sello eléctrico. Posteriormente se aplica una succión más

fuerte con la finalidad de romper la membrana que queda en el diámetro interior de la pipeta, lo que permite establecer una continuidad eléctrica (muy baja resistencia 7-10 M Ω) entre el interior de la pipeta y el interior celular.

Para los registros electrofisiológicos, se utilizó una alícuota de espermatozoides la cual se colocó en la cámara de registro situada en la platina de un microscopio invertido equipado con óptica Hoffman (Nikon Diaphot TMD, Nikon corp.). Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando un amplificador de patch clamp Axopatch 200A (Axon instruments, Foster City, CA), las micropipetas tenían una resistencia de 4-6 M Ω y la temperatura se mantuvo constante a 22°C. El potencial de mantenimiento que se utilizó fue de -90 mV para canales de Ca²⁺ y de -40 mV para el canal de K⁺ Slo3. En todos los registros las corrientes capacitivas se compensaron electrónicamente. No se utilizó ningún protocolo de resta de corriente de fuga para ninguno de los registros. Los registros de las corrientes se grabaron en línea y se digitalizaron a una velocidad de 10 KHz y se filtraron a 5 KHz. Los protocolos de pulsos, la captura de los datos se realizaron con el programa Clampex y el análisis de los registros se hicieron con el programa Clamfit contenido dentro del software pClamp 9.0 (Axon Instruments, Foster City, CA).

4.3 Soluciones de registro

4.3.1 Soluciones para registrar los canales Slo3

Para los registros de las corrientes de K⁺ se usó una solución externa que contenía lo siguiente en mM: Na-MetSO₄, 118; NaCl, 8; CaCl₂, 2.5; KSO₄, 2; MgCl₂, 1; HEPES, 10; glucosa, 3.3; y pH ajustado a 7.4 con NaOH. La osmolaridad se ajustó a 290 mOsm con dextrosa. La solución interna fue la siguiente: K-MetSO₄, 122; KCl, 8; KF, 20;

CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1; EGTA, 5; HEPES, 10; pH ajustado a pH 8 con KOH y la osmolaridad se ajustó a 270 mOsm con dextrosa.

4.3.2 Soluciones para registrar corrientes de Ca²⁺

Para aislar la corriente de Ca²⁺ tipo T y facilitar el análisis de los resultados, se utilizó la siguiente solución externa en mM: CaCl₂, 10; NaCl, 130; KCl, 3; MgCl₂, 2; NaHCO₃, 1; NaH₂PO₄, 0.5; HEPES, 5; glucosa, 10; y pH ajustado a 7.4 con NaOH. La osmolaridad se ajustó a 290 mOsm con dextrosa. La solución interna estaba compuesta por: Cs-MetSO₄, 110; CsF, 10; CsCl, 15; HEPES-Cs, 5; EGTA-Cs, 10; ATP-Mg, 4; P-creatina, 10. pH ajustado a 7.4 con CsOH, la osmolaridad final fue ~ 270 mOsm.

4.4 Patch-clamp en la gota citoplásmica

Para hacer patch-clamp en la gota citoplásmica se usaron espermatozoides testiculares, y se hicieron pruebas con espermatozoides de epidídimo, encontrándose mayor dificultad para hacer los registros en los espermatozoides de epidídimo, por lo que se prefirió usar espermatozoides testiculares. Se ha observado que debido al pequeño tamaño de las corrientes registradas, el ruido es de magnitud considerable, por lo que para eliminar una parte de este, se realizaron 5 registros para cada protocolo y se promediaron antes de hacer el análisis. Este promedio se usa para hacer la relación corriente-voltaje (relación I-V). Los datos así obtenidos de cada experimento se normalizan en relación al valor máximo de corriente obtenido en el control de cada protocolo (-30 mV para Ca²⁺ y 60 mV para K⁺). Los datos normalizados se promedian y se obtiene el error estándar de la media (E.S.M.) que se muestra en todas las gráficas de barras y de relación I-V.

V Resultados

5.1 Contribución de diversos canales a la corriente macroscópica del espermatozoide

Como se describió en la introducción, los canales epiteliales de Na^+ (ENaCs) contribuyen al potencial de reposo del espermatozoide al estar constitutivamente abiertos (Hernández-González *et al.*, 2006). Por lo que antes de hacer el estudio sobre el canal de K^+ Slo3, se probó el efecto de la amilorida a una concentración de $2 \mu\text{M}$ sobre las corrientes macroscópicas del espermatozoide de ratón. Este experimento mostró que en el espermatozoide de testículo de ratón las corrientes entrantes inducidas a potenciales hiperpolarizantes se inhiben por amilorida, y dado que en las concentraciones usadas para el registro, las corrientes generadas por canales ENaCs serían predominantemente entrantes, el efecto inhibitorio de la amilorida se deba a la presencia en el espermatozoide de canales de Na^+ tipo ENaCs (figura 6 A y B).

Otro tipo de canales que podría encontrarse activo en el espermatozoide, son los canales de K^+ tipo Kir regulados por ATP (K_{ATP}). Los canales K_{ATP} son sensibles a compuestos tales como tolbutamida ($500 \mu\text{M}$) meglitinida ($10 \mu\text{M}$) o glibenclamida (100nM) y son rectificadores entrantes débiles (Ashcroft & Ashcroft, 1990). Se ha probado que la tolbutamida inhibe los canales K_{ATP} en células espermátogénicas de ratón y afecta el E_m de espermatozoides no capacitados (Acevedo *et al.*, 2006). Los canales K_{ATP} al ser inhibidos por ATP funcionan como acopladores del estado metabólico y la actividad eléctrica de la célula. Los canales K_{ATP} están constituidos por una subunidad receptora de sulfonilureas (SUR1) y una subunidad de canal rectificador entrante (Kir). Para confirmar la presencia funcional de canales K_{ATP} en el espermatozoide y descartar su contribución a la corriente, se realizaron registros de corrientes totales con las soluciones para los canales Slo3 y después se agregó tolbutamida. Se observó una inhibición significativa sobre las corrientes salientes espermáticas (figura 6C y D). Estos

resultados muestran por primera vez que efectivamente los canales K_{ATP} están presentes funcionalmente en el espermatozoide de ratón.

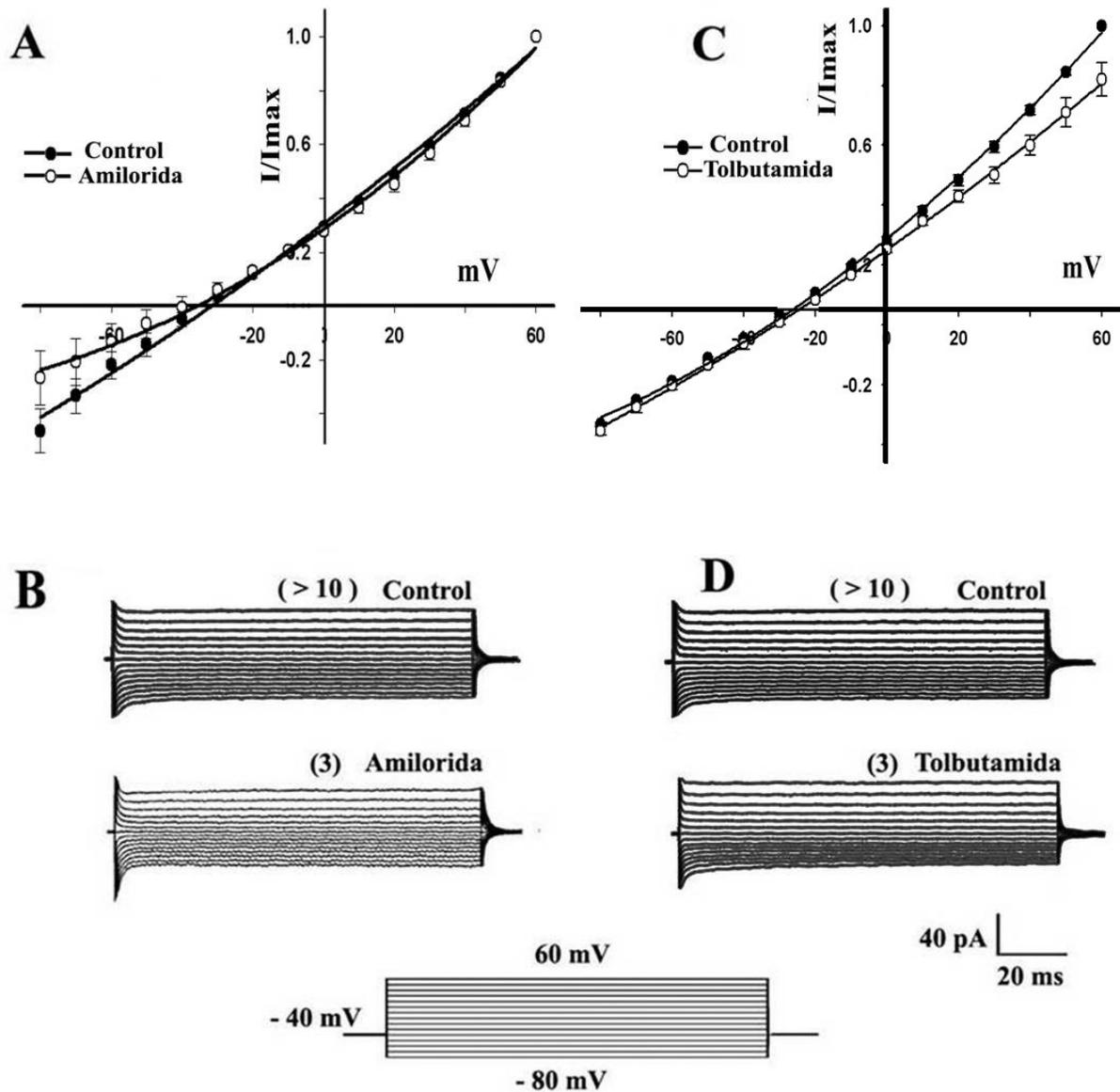


Figura 6: Efecto de la amilorida y la tolbutamida sobre las corrientes del espermatozoide. **A.** La amilorida disminuye las corrientes a potenciales negativos, lo cual sugiere la presencia de canales ENaC funcionales en el espermatozoide. **B.** Corrientes promedio correspondientes a la relación I-V mostrada en A. Arriba control, comparado con amilorida (Abajo). **C.** El efecto de la tolbutamida es significativo y sólo presente a potenciales positivos, posiblemente esta inhibición se genera por la presencia de canales K_{ATP} . **D.** Comparación de la familia de corrientes control contra las corrientes en presencia de tolbutamida. Los números en paréntesis corresponden al valor de n .

5.2 Caracterización de corrientes de K⁺ (Slo3)

Al iniciar la caracterización del canal Slo3 en espermatozoide se identificaron las propiedades de modulación por Ca²⁺, pHi, AMPc y voltaje, que se han descrito para este canal expresado heterológicamente (Schreiber *et al.*, 1998). En los primeros experimentos (Figura 7) se obtuvieron corrientes sostenidas en el control, aunque con ligera inactivación durante los primeros 10 ms. Estas corrientes no fueron sensibles a la ausencia de Ca²⁺_i (figura 7A), el canal Slo3 no es modulado por la [Ca²⁺]_i en tanto que su homólogo Slo1 perteneciente a la familia de canales Slo es activado sinérgicamente por Ca²⁺_i, al realizar los experimentos en baja [Ca²⁺]_i no se observan diferencias significativas en la corriente saliente, lo cual sugiere que el canal que permite este flujo no es sensible a Ca²⁺_i y descarta la posibilidad de la contribución del Slo1 en estas corrientes. Los experimentos realizados en solución externa con baja [Ca²⁺]_e muestran que la corriente decrece solo a potenciales negativos. Dado que flujos a estos potenciales no se esperan para el Slo1 ni el Slo3 que la baja [Ca²⁺]_e puede estar inhibiendo otro tipo de canales como ENaCs y TRPs que pudieran estar contribuyendo en nuestro registro.

Posteriormente se probó la sensibilidad de las corrientes a cambios en el pHi. Se alcalinizó el pHi perfundiendo durante 2 min. una solución externa que contenía 30 mM de NH₄Cl. La alcalinización del medio intracelular incrementó significativamente las corrientes salientes (figura 7B).

Se estudiaron también los efectos de elevar la [AMPc]_i sobre las corrientes del espermatozoide. Estos experimentos se realizaron usando una concentración de 400 μM de 8-Br-AMPc, un análogo permeable del AMPc. Este análogo es también resistente a la acción de las fosfodiesterasas, por lo que no fue necesario utilizar inhibidores como el IBMX para mantener su efecto. Los experimentos mostraron que el 8-Br-AMPc modula las corrientes del espermatozoide,

ya que su aplicación incrementó en promedio ~90% las corrientes a potenciales positivos (figura 7C).

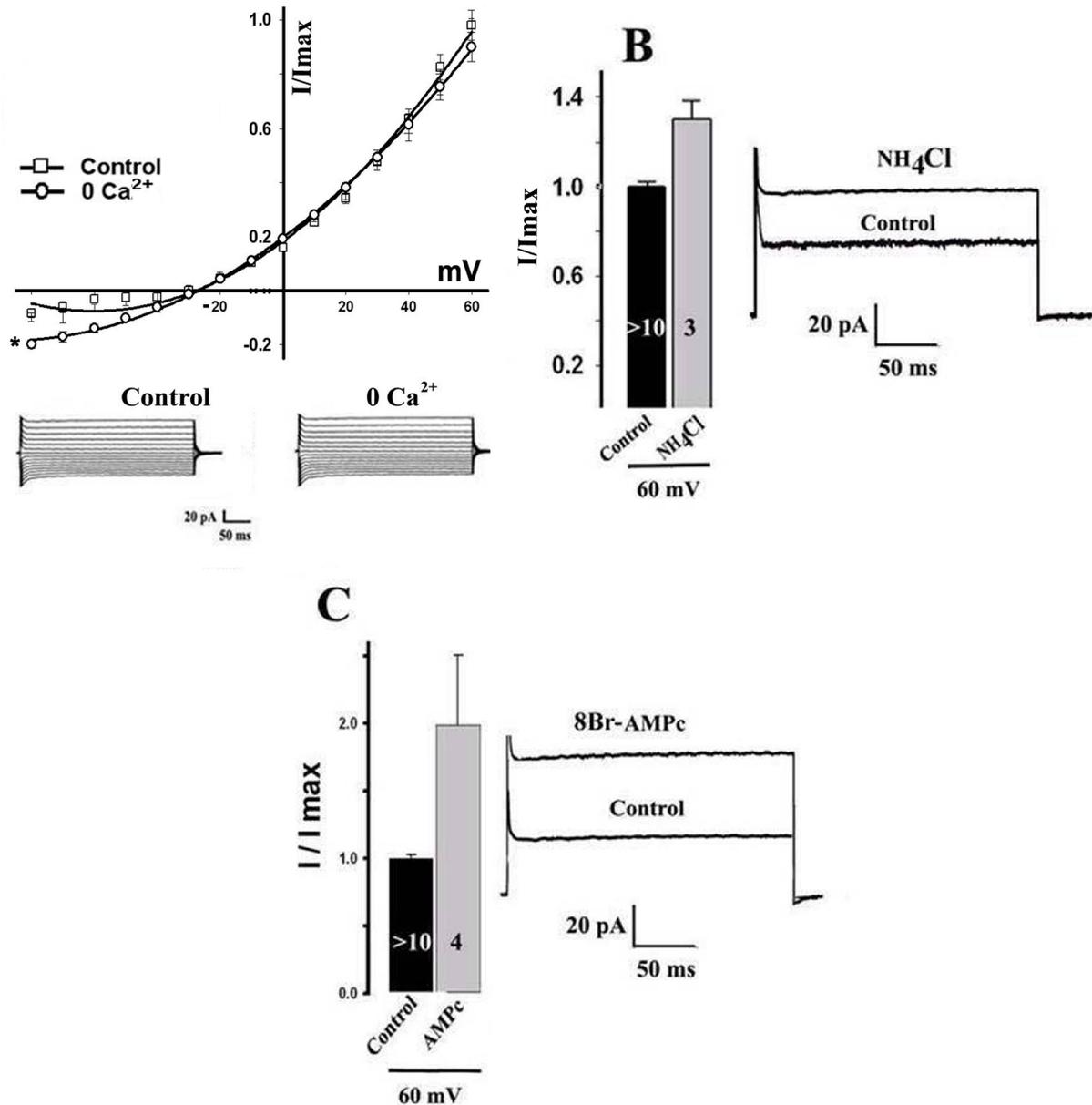


Figura 7: Caracterización del efecto del $[Ca^{2+}]_i$, pH y el AMPC sobre las corrientes del espermatozoide de ratón.

A. Relación I-V del control (cuadros) y en ausencia de $[Ca^{2+}]_i$ (10 mM de EGTA, [triángulos]). La parte inferior muestra la correspondiente familia de corrientes. **B.** Efecto de la alcalinización sobre las corrientes del espermatozoide a 60 mV (los números en las barras corresponden a la n). **C.** La aplicación de 8-Br-AMPC incrementó las corrientes salientes (el incremento es de ~ 90%) y se muestran las correspondientes corrientes a 60 mV. (En todas las graficas se muestra la corriente normalizada en relación a la corriente observada a los 60 mV en el registro control).

La alcalinización del medio intracelular y la elevación de la $[AMPC]_i$ podrían activar canales como los ENaCs y/o los K_{ATP} s. Considerando lo anterior, los siguientes experimentos se diseñaron con la finalidad de obtener corrientes iónicas que estén constituidas en su mayoría por el canal Slo3. Con este objetivo se utilizó amilorida $2 \mu M$, que inhibe a los canales ENaCs, que se han encontrado por inmunología y farmacología en células espermáticas y en el espermatozoide de ratón (Hernández-González *et al.*, 2006). Y con la finalidad de bloquear las corrientes iónicas generadas por los canales K_{ATP} , se usó tolbutamida a una concentración de $500 \mu M$ (Acevedo *et al.*, 2006). Los registros con amilorida y tolbutamida se muestran como el “Control*” en las figuras siguientes (figura 8 en adelante).

Utilizando amilorida y tolbutamida en el medio extracelular para eliminar la contribución de los ENaCs y K_{ATP} s a las corrientes totales, se estudiaron los efectos de alcalinizar con NH_4Cl , aumentar la $[AMPC]_i$, así como el efecto de ambos agentes juntos (figura 8).

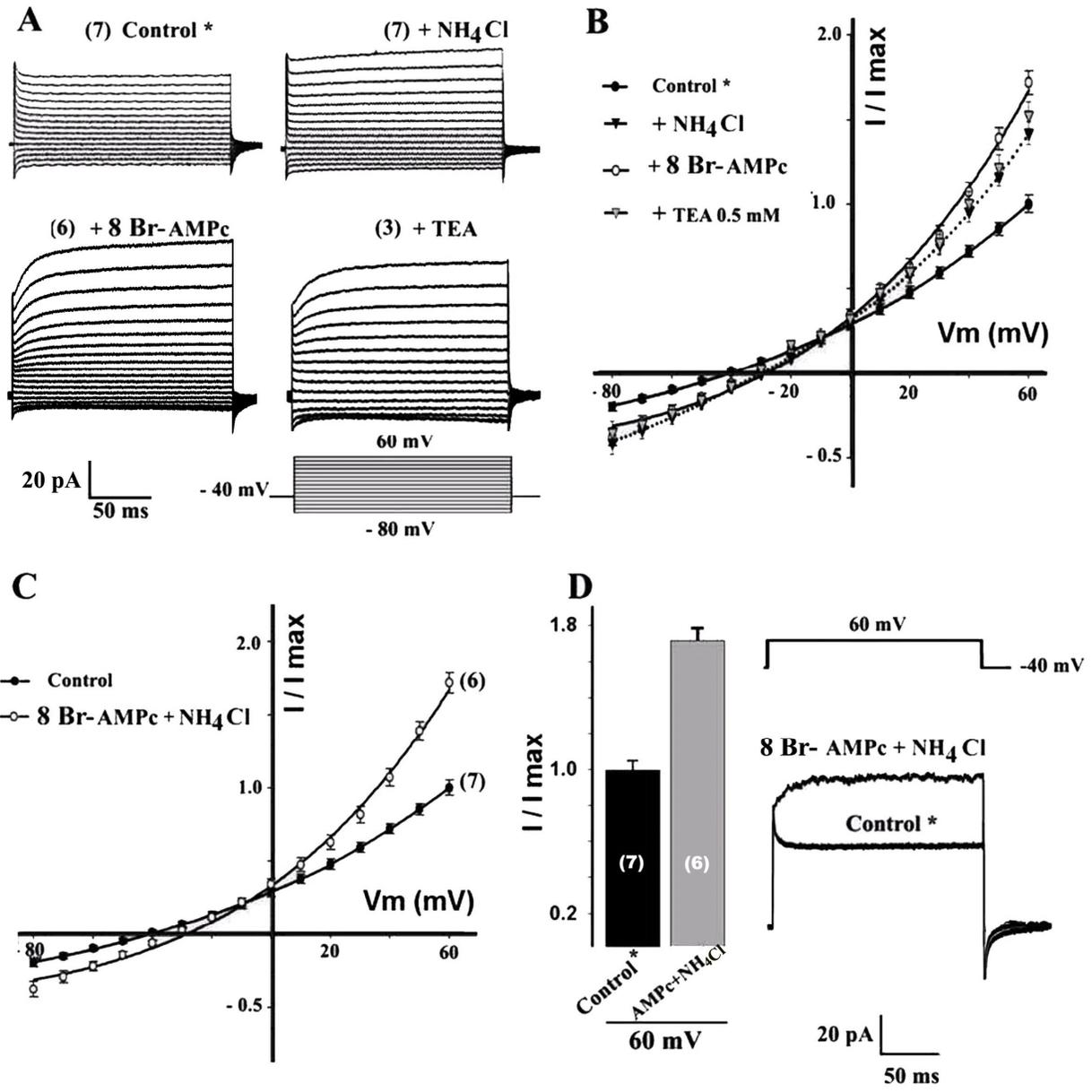


Figura 8: Efecto del incremento en el pHi mediante NH₄Cl y la aplicación de AMPc permeable (8-Br-AMPc) sobre las corrientes salientes espermáticas.
A. Familia promedio de corrientes correspondientes a las relaciones I-V de la figura B. **B.** Relación I-V de la corriente en presencia de tolbutamida (500 μM) y amilorida (2 μM) (círculos negros) en comparación con la corriente registrada al agregar NH₄Cl, 8 Br-AMPc y TEA 0.5 mM. **C.** Relación I-V que muestra comparativamente el control* y la adición de 8-Br-AMPc y NH₄Cl. **D.** Comparación de la corriente control* y la obtenida al agregar 8-Br-AMPc y NH₄Cl a 60 mV. A la derecha, corrientes correspondientes a la gráfica de barras (60 mV). El valor de n se muestra en paréntesis. La corriente se normalizo en relación al valor obtenido al potencial de 40 mV en el control (Los controles marcados con * se realizaron en presencia de amilorida y tolbutamida).

Para tener evidencia de que la activación por alcalinización intracelular y 8-Br-AMPC se debe al canal Slo3, se registraron las corrientes en presencia de 0.5 mM TEA. A esta concentración, este bloqueador inhibe completamente al canal Slo1, mientras que el canal Slo3 permanece activo en un 80% (Santi, comunicación personal). El TEA 0.5 mM inhibe solo el 10% \pm 2 de la corriente en presencia de 8-Br-AMPC + NH₄Cl por lo que el canal Slo3 podría estar contribuyendo de forma importante a la corriente espermática en tanto que la inhibición por TEA 0.5 mM puede ser sobre algún canal del tipo TRP ya que como se mostró anteriormente, una baja concentración de Ca²⁺ no tiene efecto sobre la corriente saliente, así Slo1 puede no contribuir de manera importante a las corrientes registradas en el espermatozoide testicular en presencia de estos agentes o bien, en el experimento en el que se probó su activación por [Ca²⁺]_i Slo1 se encontraba inactivo (Figura 8). Otro factor modificado por la adición de 8-Br-AMPC y NH₄Cl fue el potencial de inversión que cambió de -40.5 mV en el control, a -28 mV con 8-Br-AMPC y NH₄Cl. Se ha probado que el Na⁺ contribuye al potencial de mantenimiento del espermatozoide por lo que al activar el canal de K⁺ Slo3, que permite el paso de Na⁺ al interior celular, se desplaza el potencial de inversión hacia el potencial de equilibrio del Na⁺. Sin embargo en los experimentos con corrientes de cola para tener una medición del potencial de inversión, solo se estudió el efecto del cambio en la relación Na⁺/K⁺ del medio extracelular, pero no se estudió el efecto sobre el potencial de inversión de la adición de 8-Br-AMPC y NH₄Cl.

Aún cuando las corrientes generadas en presencia de NH₄Cl y 8-Br-AMPC tienen una cinética similar a la reportada para el canal Slo3, es todavía necesario probar que estas fluyen a través del canal Slo3. Se ha probado en expresión heteróloga que 60 mM de TEA puede inhibir el canal Slo3 en un 80 %. En estas condiciones la estimulación de la corriente registrada en presencia de NH₄Cl y 8-Br-AMPC fue solo parcialmente inhibida, pero de manera reproducible. La adición de

TEA 60 mM al medio extracelular además de disminuir la amplitud de las corrientes, modifica su cinética de activación (Fig. 9 A).

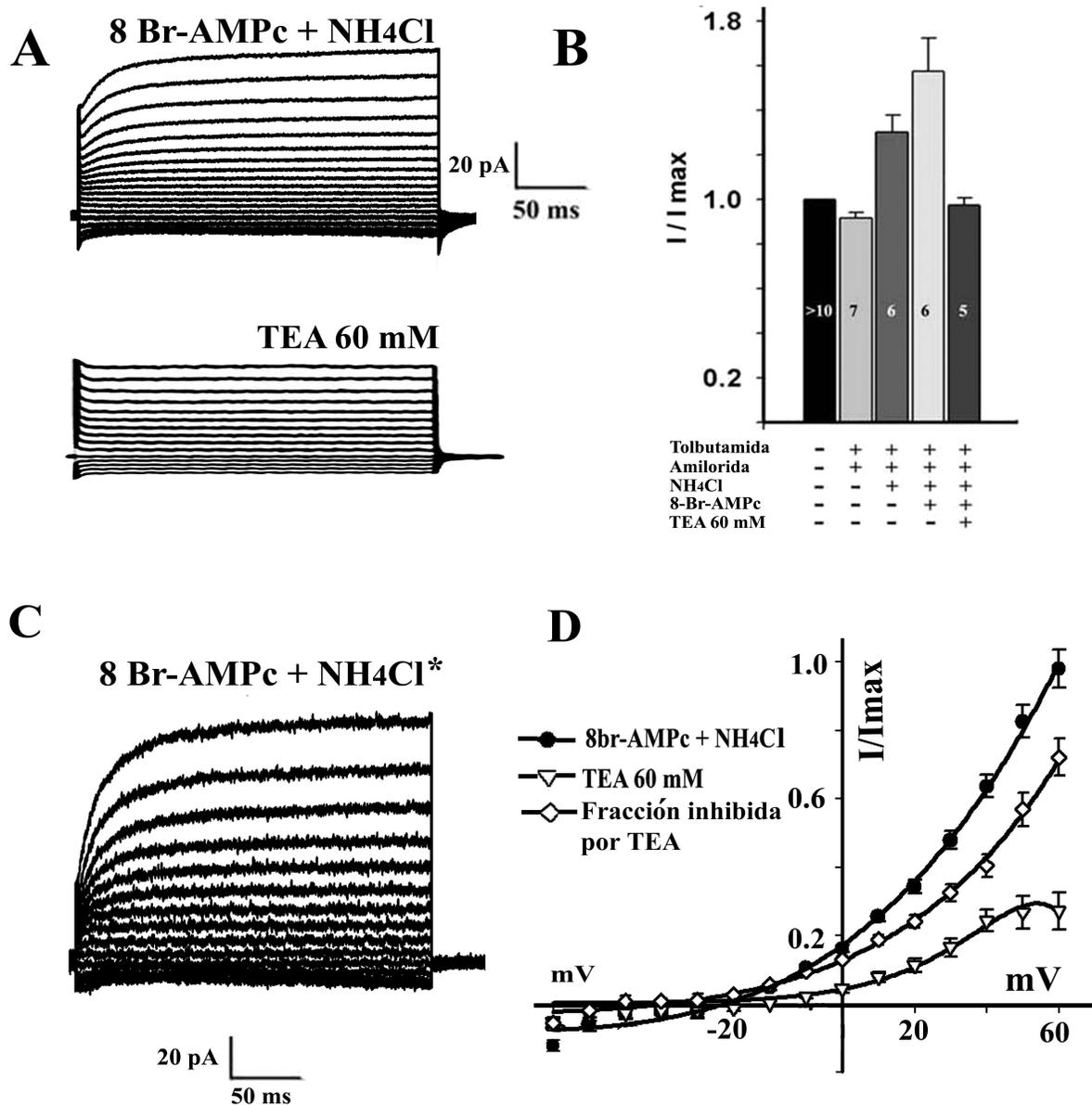


Figura 9: La aplicación de 60 mM de TEA bloquea parcialmente el incremento en las corrientes inducido por 8-Br-AMPC y NH₄Cl. **A.** Comparación de las corrientes registradas en presencia de NH₄Cl + 8-Br-AMPC y con 60 mM de TEA. **B.** Barras comparativas de la corriente registrada a 60 mV después de agregar NH₄Cl y 8-Br-AMPC. El TEA a 60 mM inhibe este incremento en un 78% ± 6 (n = 4), lo cual sugiere que esta activación es consecuencia del aumento en la probabilidad de apertura del canal Slo3. **C.** Se muestra la fracción inhibida por TEA obtenida de la resta numérica de la corriente con (8-Br-AMPC + NH₄Cl) – la corriente remanente al adicionar TEA 60 mM. **D.** Resta numérica de la corriente activada por NH₄Cl y 8-Br-AMPC (τ activación ~17 ± 3 ms) menos la corriente control, las restas permiten eliminar de los registros la corriente presente en el control, observar mejor la inhibición por TEA así como la relación I-V de la corriente inhibida por TEA que podría ser Slo3.

Es probable que las corrientes espermáticas estén compuestas por una gran diversidad de canales iónicos, algunos de los cuales no son sensibles a las concentraciones usadas de amilorida, tolbutamida y TEA. Para eliminar esta corriente “de fondo” de la corriente registrada en presencia de NH_4Cl y 8-Br-AMPC se realizó una resta numérica entre la corriente activada por NH_4Cl y 8-Br-AMPC menos la corriente control* (figura 9 C). Esta operación nos permitió obtener la corriente estimulada por estos factores y también restando del control la corriente remanente tras la aplicación de TEA 60 mM, podemos observar la corriente que es sensible a estas concentraciones de bloqueador (figura 9 D). Desafortunadamente aun no se conocen inhibidores específicos para el canal Slo3. Recientemente se han realizado experimentos en expresión heteróloga en los cuales se probó que la adición de Ba^{2+} 1 mM inhibe cerca del 90 % de la corriente de Slo3 (Santi C. comunicación personal), se observó que esta concentración de Ba^{2+} inhibe el 42% ± 2 y su efecto se analizó restando el control menos la corriente resistente al Ba^{2+} 1 mM (Figura 11).

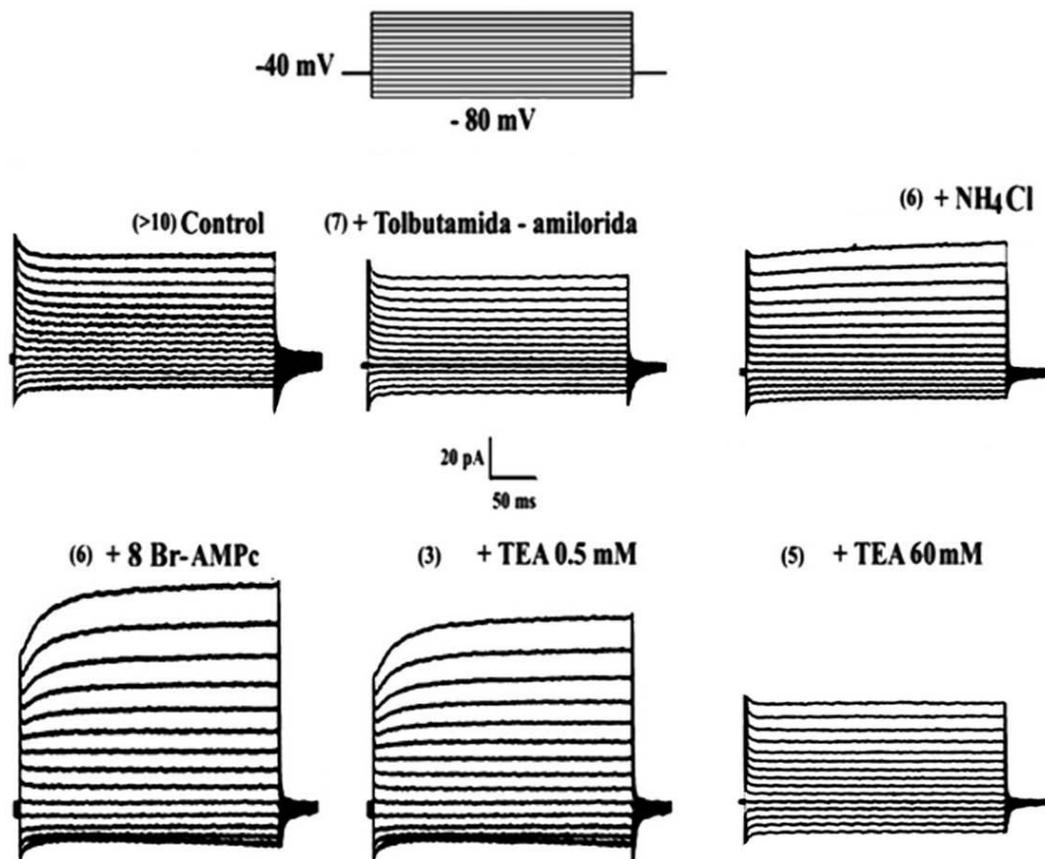


Figura 10: Recopilación de las corrientes generadas por Slo3 en espermatozoide de ratón. De izquierda a derecha: control, control* (en presencia de tolbutamida 500 μ M y amilorida 2 μ M), alcalinización intracelular con NH₄Cl, adición de 8-Br-AMPC, TEA 0.5 mM para conocer la participación de Slo1 en estas corrientes y TEA 60 mM para conocer la posible contribución de Slo3.

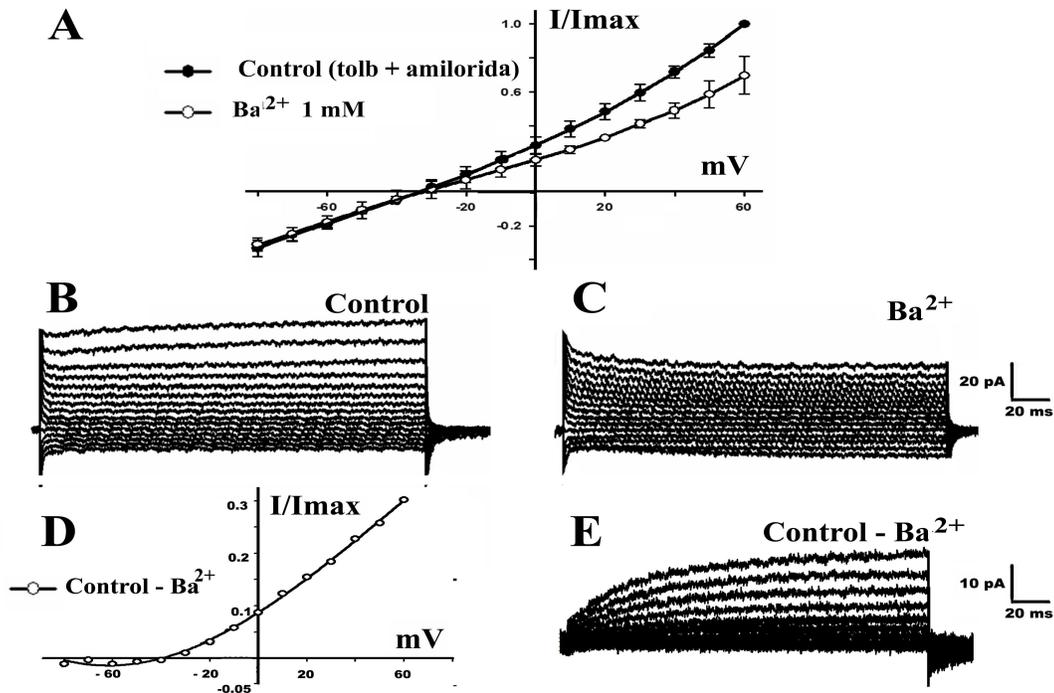


Figura 11: Efecto del Ba²⁺ 1 mM sobre las corrientes espermáticas. A. Relación I-V del control y efecto de Ba²⁺ 1 mM. B-C. Corriente nativa control y en presencia de Ba²⁺ respectivamente. D. Relación I-V obtenida después de realizar la substracción del control menos la corriente remanente en presencia de Ba²⁺ 1 mM. E. Familia de corrientes después de la resta del control menos la corriente remanente con Ba²⁺ lo cual corresponde a la cantidad de corriente que fue inhibida por Ba²⁺ 1 mM.

5.3 Análisis de la corriente instantánea en las corrientes espermáticas

Los registros de patch clamp mostraron que los saltos de voltaje del potencial de mantenimiento de -40 mV a cada pulso de voltaje inducen una corriente temprana o “corriente instantánea”. Para analizar este componente es necesario descartar el componente capacitivo que se observa a los 6.6 ms. Por lo tanto se midió la corriente a los 8.8 ms de iniciado el pulso de prueba. Se observó que la corriente instantánea incrementa en forma lineal en relación al potencial aplicado. Esta corriente resultó ser sensible a la aplicación de los inhibidores amilorida y tolbutamida. Esto es consistente con la presencia de canales ENaC y K_{ATP} que son poco voltaje-dependientes (aunque los canales K_{ATP} son considerados rectificadores entrantes, su rectificación es muy débil). En las

corrientes instantáneas en presencia de tolbutamida y amilorida, la alcalinización intracelular con NH_4Cl solo tuvo un pequeño efecto incrementando ligeramente la conductancia. Los K_{ATPS} se estimulan al aumentar el pHi (Acevedo *et al.*, 2006). Por otra parte, estas corrientes instantáneas se activaron ~50% tras la aplicación de 8-Br-AMPC, son poco sensibles a 0.5 mM de TEA pero se bloquean significativamente con TEA 60 mM (Figura 12).

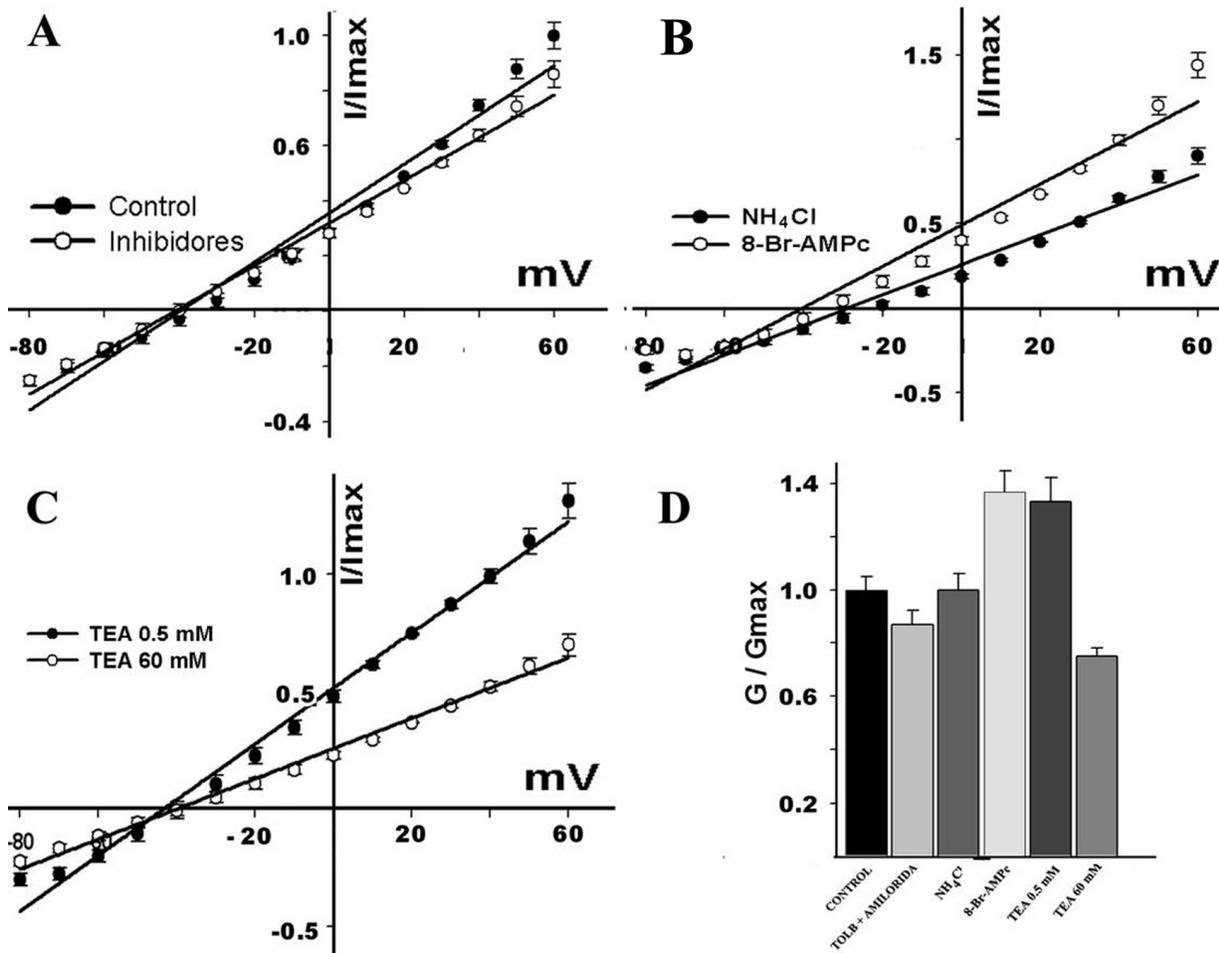


Figura 12. Análisis de corriente instantánea. **A.** Relación I-V obtenida de medir la corriente a los 8.8 ms en el registro control y en presencia de los inhibidores tolbutamida y amilorida. **B.** Relación I-V de registros aumentando pHi con NH_4Cl y después de agregar 8-Br-AMPC. **C.** Inhibición por TEA aplicado a una concentración de 0.5 mM y 60 mM. **D.** Grafica de barras que muestra el cambio en la conductancia en cada experimento, se muestra el coeficiente de correlación para una recta en el interior de las barras para confirmar el comportamiento lineal de las corrientes instantáneas.

5.4 Estudio del potencial de inversión (PI) de las corrientes espermáticas

Se ha reportado en sistemas de expresión heteróloga que el canal Slo3 tiene un coeficiente de selectividad Na^+/K^+ de 0.21 (Schreiber *et al* 1998). Para continuar con la identificación funcional de Slo3 en el espermatozoide de ratón testicular, se determinó la sensibilidad del PI a cambios en la concentración del K^+ externo. Se probaron las siguientes concentraciones de $[\text{K}^+]_e$: 2 mM, 14 mM, 61 mM y 91 mM y el incremento en la concentración de K^+ extracelular se complementó con una disminución de igual magnitud sobre el Na^+ extracelular. La concentración de Cl^- extracelular permaneció constante. Sin embargo como se muestra en la figura 13, el potencial de inversión teórico para un coeficiente de selectividad Na^+/K^+ de 0.21 reportado para el Slo3 difiere del potencial de inversión obtenido experimentalmente. Esta discrepancia probablemente se debe a la presencia de canales iónicos insensibles a amilorida y tolbutamida que son diferentes a Slo3. Dichos canales podrían ser permeables a Ca^{2+} o a Cl^- , lo cual contribuiría a que el potencial de inversión experimental difiera del potencial de inversión teórico calculado a partir de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$\text{PI} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}} [\text{K}^+]_e + P_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_e}{P_{\text{K}} [\text{K}^+]_i + P_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_i}$$

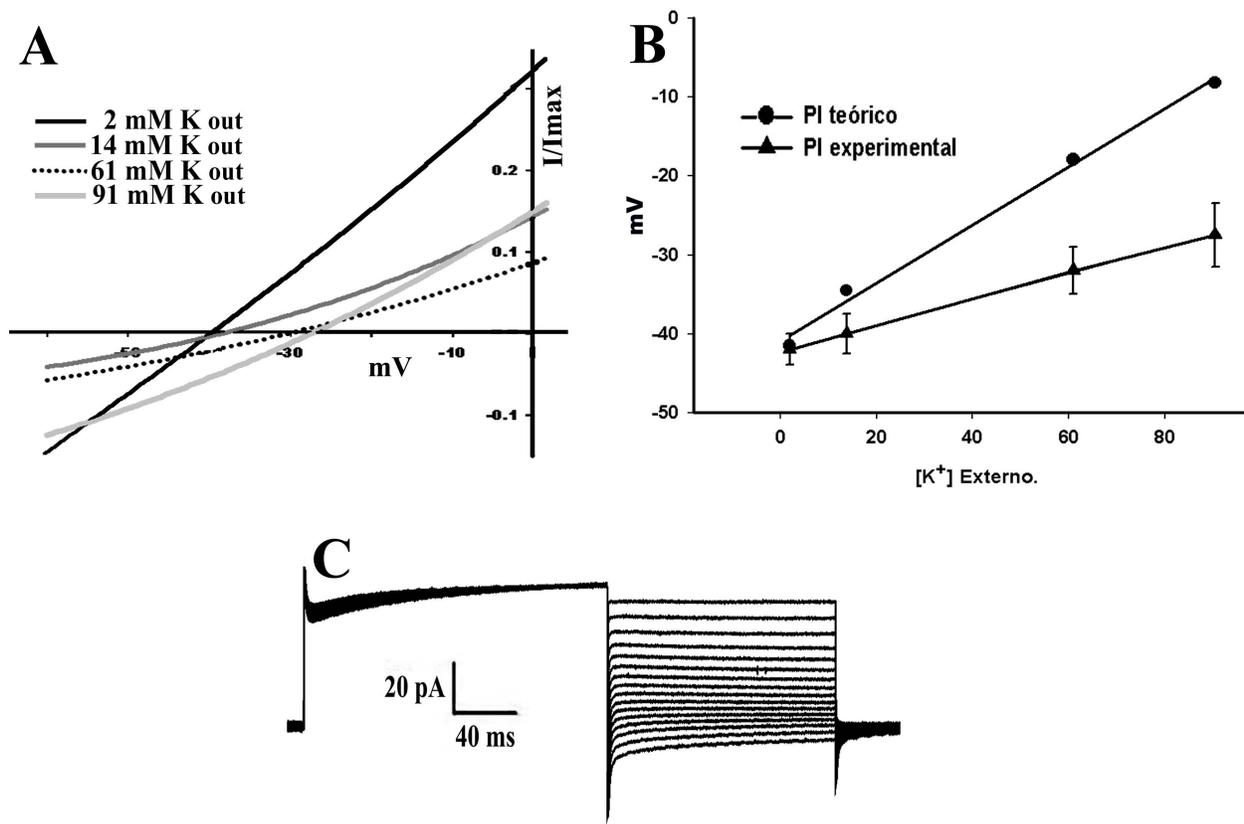


Figura 13: Potenciales de inversión (PI) de las corrientes de K^+ del espermatozoide en función de la concentración de K^+ externo. **A.** Relación I-V obtenida a partir del ajuste generado en cada una de las gráficas experimentales (solo se muestran valores cercanos al punto de inversión para su mejor apreciación). **B.** Comparación del potencial de inversión teórico y el potencial de inversión experimental. Se observa una diferencia significativa entre el potencial de inversión teórico y el potencial de inversión experimental. **C.** Corrientes de cola representativas a partir de las cuales se calcularon los potenciales de inversión mediante una regresión lineal de la corriente medida a los diferentes voltajes.

5.5 Corrientes de Ca^{2+} de espermatozoides testiculares de ratón

Los estudios de corrientes de Ca^{2+} en el espermatozoide de ratón testicular mostraron que efectivamente esta célula tiene corrientes de Ca^{2+} tipo T. Estas corrientes presentan el patrón clásico de entrecruzamiento debido que la cinética de activación cambia con el potencial debido a que los canales tipo T tienen un periodo de latencia antes de la primera apertura que incrementa con voltajes negativos (Figura 14A) y la voltaje dependencia de los canales tipo T. Las corrientes de Ca^{2+} transitorias que se han registrado son sensibles a mibefradil a una concentración de $10 \mu M$

que las inhibe casi por completo (~90%) (Figura 14C). Estas corrientes presentan una activación máxima a un potencial de -30 mV en promedio. Vale la pena resaltar que esta es la primera vez que se logra registrar corrientes macroscópicas de Ca^{2+} dependientes de voltaje directamente en el espermatozoide de mamífero (Figura 14).

La corriente control se recupera un 80% tras la remoción del inhibidor mibefradil. Ya que la mayoría de los inhibidores tienen algún efecto sobre otros factores celulares, para verificar la presencia de canales de Ca^{2+} tipo T en el espermatozoide, se probó 2 μM de nifedipina. A esta concentración, la nifedipina es un agente inhibidor de canales de Ca^{2+} tipo T e inhibe a las corrientes en una proporción del 80%.

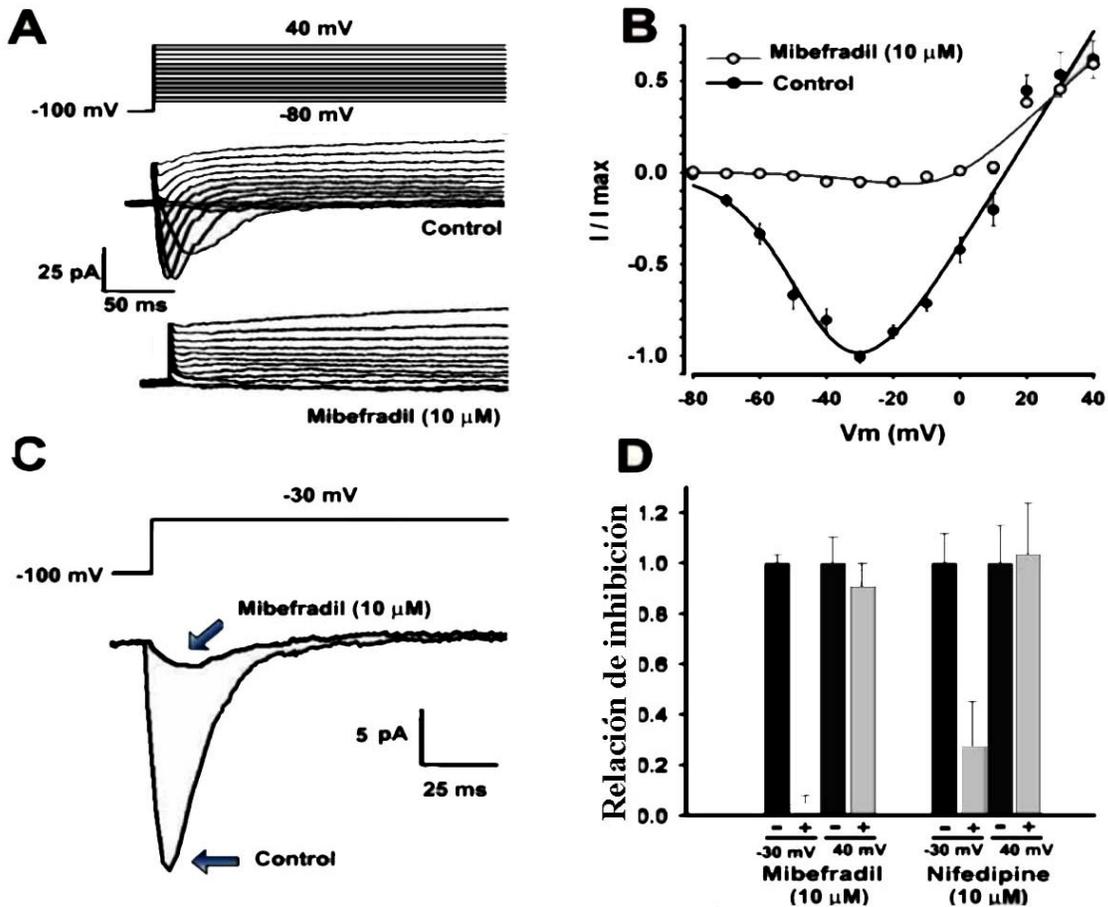


Figura 14: Corrientes de Ca^{2+} tipo T en el espermatozoide testicular. A. Familia de corrientes de Ca^{2+} en el espermatozoide, se observa en la corriente control un componente entrante transitorio y un componente saliente de comportamiento constante (trazo superior). La adición de mibefradil ($10 \mu\text{M}$), inhibe el componente entrante de la corriente, pero no así las corrientes salientes. B. Relación I-V de las corrientes iónicas mostradas en el panel A en ausencia (control; círculos negros) y en presencia de mibefradil $10 \mu\text{M}$ (círculos blancos; $N = 4$). C. Comparación de la amplitud de la corriente control y con mibefradil al potencial de $+40 \text{ mV}$. D. Diez μM de mibefradil y $10 \mu\text{M}$ de nifedipina inhiben el componente entrante un 90% y 80% , respectivamente al potencial de -30 mV .

VI Discusión

En los registros de corrientes macroscópicas del espermatozoide se observaron componentes entrantes que se inhiben con amilorida y corrientes salientes que se inhiben con tolbutamida. Estos resultados son consistentes con la actividad de canales ENaC y K_{ATP} cuya presencia se había documentado detectando sus mensajeros en células espermatogénicas, la expresión de las proteínas en el espermatozoide y por ensayos funcionales de capacitación y RA (Acevedo *et al.*, 2006; Hernández-González *et al.*, 2006).

El RNAm del canal Slo3 se detectó solo en células espermatogénicas (Shreiber *et al.*, 1998). Sin embargo su actividad no se documentó más que en expresión heteróloga. Este canal se ha detectado inmunológicamente en el flagelo de espermatozoides de ratón. Los estudios electrofisiológicos sobre el canal Slo3 expresado heterológamente mostraron que tanto el pHi como el voltaje lo modulan (Shreiber *et al.*, 1998).

Es importante señalar que hasta ahora no se habían registrado corrientes de K^+ en el espermatozoide. El único canal que se había caracterizado usando la estrategia de la gota citoplásmica para lograr la configuración de célula completa es el CatSper (Kirichok *et al.*, 2006). El estudio electrofisiológico de Slo3 en el espermatozoide es de gran interés por un lado porque nunca se había llevado a cabo y es el tipo celular en el que se expresa naturalmente. Por otro lado, los factores que modulan a Slo3 cambian durante la capacitación y la RA.

Por otra parte, la fracción de la corriente que es activada por 8-Br-AMP e insensible a amilorida, tolbutamida y 0.5 mM TEA, solo se inhibe significativamente con una concentración de 60 mM de TEA. Estos resultados globalmente sugieren que el canal Slo3 puede ser responsable de estas corrientes. Experimentos de expresión heteróloga

que ha realizado Celia Santi en el laboratorio de Salkoff con quienes estamos colaborando, muestran que Slo3 se estimula con AMPc y que se necesita 60 mM de TEA para bloquear estas corrientes. Ella también demostró que el canal Slo3 se bloquea con 1 mM de Ba²⁺. Es importante resaltar que la cinética y voltaje-dependencia de la corriente sensible a 60 mM de TEA es parecida a las corrientes de Slo3 en el sistema heterólogo (figura 15). Ya que el TEA particularmente a 60 mM puede bloquear a varios tipos de canales de K⁺, como los canales de K⁺ de fuga y los canales de K⁺ activados por voltaje (MacKinnon and Yellen, 1990), fue necesario hacer los experimentos con Ba²⁺. Los resultados de bloqueo con 1 mM de Ba²⁺ son consistentes con la presencia del canal Slo3 en el espermatozoide de ratón. El Ba²⁺ no es un agente inhibitorio ni para los canales de Ca²⁺ tipo T ni para los canales TRP (Gwanyanya *et al* 2004).

En el estudio de sustitución iónica para conocer la selectividad de la corriente estudiada que pensamos corresponde al canal Slo3, se encontró una diferencia significativa entre el potencial de inversión teórico y el potencial de inversión obtenido experimentalmente con el protocolo de corrientes de cola. Vale la pena resaltar que los experimentos en el espermatozoide de ratón se hicieron en condiciones en las que canales de Ca²⁺ y Cl⁻, podrían contribuir a la corriente. La contribución de estos canales podría explicar la desviación de los potenciales de inversión que se obtuvieron experimentalmente. Considerando que ni los canales de Cl⁻, ni los TRP se han caracterizado funcionalmente en el espermatozoide, su contribución al cambio en el potencial de inversión no se puede estimar en el presente.

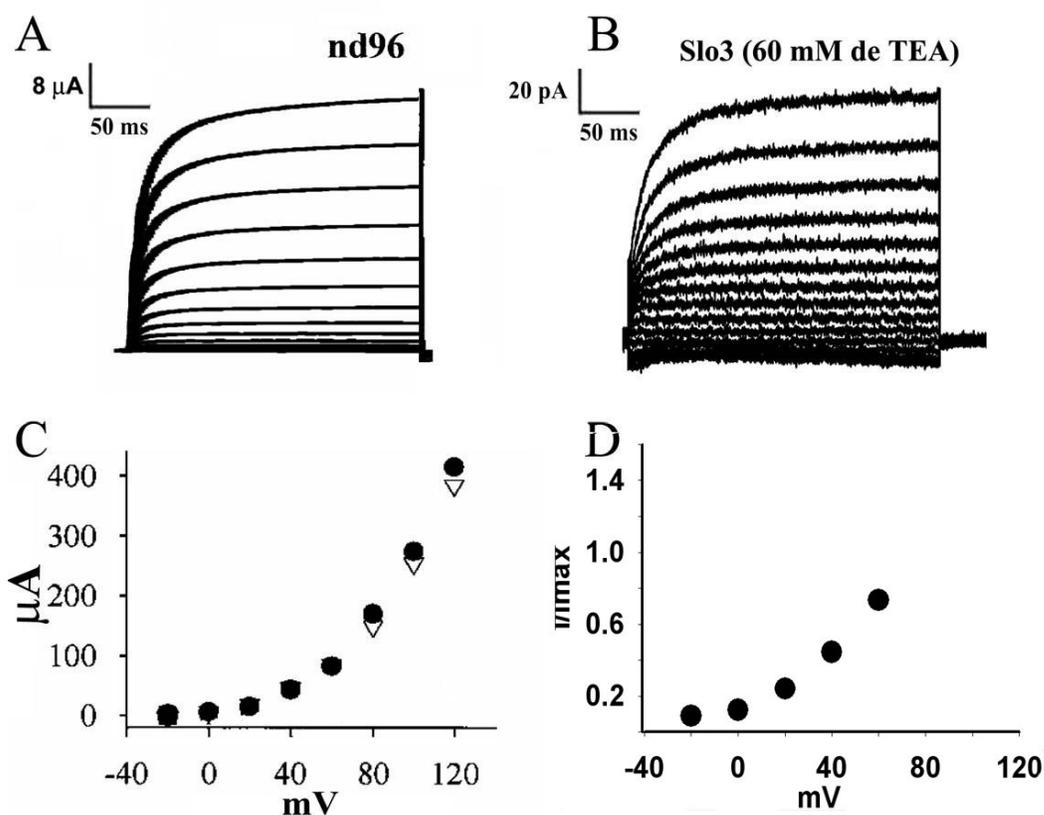


Figura 15: Comparación de la corriente registrada en espermatozoide y la registrada en expresión heteróloga. A corriente registrada en ovocitos de *Xenopus laevis*. B. corriente registrada en espermatozoides obtenida de restar la corriente con 8-Br-AMPC menos la corriente control. C-D relación I-V de la corriente en expresión heteróloga y en espermatozoides respectivamente.

Los experimentos realizados en este trabajo sugieren la presencia del canal Slo3 en el espermatozoide, a pesar de que no fue posible realizar experimentos comparativos con ratones nulos para Slo3 debido a que aun no se ha desarrollado este genotipo. Un experimento que podría confirmar definitivamente la funcionalidad de Slo3 en espermatozoide es la medición de la corriente unitaria del canal. La medición de corrientes unitarias de Slo3 en la gota citoplásmica no es viable ya que las inmunolocalizaciones muestran que este canal no se encuentra en la gota citoplásmica.

Las corrientes unitarias del canal slo3 se podrían medir usando la técnica del Smart patch-clamp sobre el flagelo, que es la región del espermatozoide en la que inmunológicamente se ha detectado.

6.1 Posible papel fisiológico del canal Slo3

Debido a la sensibilidad que presenta Slo3 a pHi y AMPc, este canal puede estar involucrado en la capacitación espermática y/o la reacción acrosomal. Estos son pasos esenciales en donde ocurren cambios en el pHi y en el Em. En el espermatozoide de ratón y algunas otras especies, ocurre una alcalinización e hiperpolarización durante la capacitación (Darszon *et al.*, 2006). También aumenta el AMPc y posiblemente se activan canales de K⁺ del tipo rectificador entrante (Hernández-González *et al.*, 2006). En cambio, el incremento en la concentración de AMPc y el pHi favorecerían su apertura cuando el Em este despolarizado durante la reacción acrosomal.

Durante la RA de mamífero la unión del agonista al receptor induce una despolarización del Em que favorece un incremento transitorio en la [Ca²⁺]_i y una alcalinización regulada por proteínas G sensibles a la toxina de *pertussis*. La despolarización del Em y la alcalinización podrían favorecer la activación del canal Slo3. Sin embargo es necesario realizar estudios donde se pueda relacionar directamente a este canal con alguno de los procesos de capacitación y/o RA e inclusive movilidad.

6.2 Inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo T

Existen numerosos estudios de fluorescencia con colorantes sensibles a Ca²⁺, así como estudios de inmunolocalización que han demostrado la presencia y participación de canales de Ca²⁺ tipo T en la entrada transitoria de Ca²⁺ que ocurre durante el inicio de la RA en el espermatozoide de ratón (Darszon *et al.*, 2006). Sin embargo, aún cuando se

registraron corrientes tipo T en células espermatogénicas de ratón y humano (Lievano *et al.*, 1996; Arnoult *et al.*, 1996), nunca antes se habían registrado corrientes macroscópicas de canales de Ca^{2+} tipo T en el espermatozoide. Dada la gran relevancia de estos canales de Ca^{2+} para la RA, estos se estudiaron en espermatozoides testiculares aprovechando la estrategia de sellar en la gota citoplásmica. Se documentaron corrientes de Ca^{2+} que tienen las clásicas propiedades de voltaje dependencia y cinética de los canales de Ca^{2+} tipo T (Figura 14; Pérez-Reyes 1999; Darszon *et al.*, 2006). Como sería de esperarse, dichas corrientes se bloquearon por nifedipina y mibefradil a las concentraciones reportadas para canales de Ca^{2+} tipo T. El compuesto mibefradil, considerado más específico para canales de Ca^{2+} tipo T que la nifedipina (Arnoult *et al.* 1998), inhibió las corrientes del espermatozoide de ratón a la concentración esperada confirmando la presencia de canales de Ca^{2+} tipo T funcionales en esta célula.

VII Conclusiones

7.1 Presencia del canal Slo3 en espermatozoide

Las pruebas con los inhibidores tolbutamida y amilorida sugieren la presencia en el espermatozoide de canales de K^+ tipo K_{ATP} y de canales ENaC, respectivamente. Estos canales solo se habían detectado inmunológicamente en espermatozoides maduros y en células espermatogénicas y se han registrado electrofisiológicamente en células espermatogénicas. Aún cuando las contribuciones de ambos son relativamente pequeñas, estas son significativas. Debe considerarse que se han identificado inmunológicamente varios tipos de canales iónicos en el espermatozoide y que las condiciones iónicas que se usaron se diseñaron para registrar al canal de K^+ Slo3.

Al adicionar al medio los inhibidores amilorida y tolbutamida, el porcentaje de incremento en las corrientes generado por el 8-Br-AMPC es menor que en ausencia de estos inhibidores, por lo que una parte de este incremento se debe posiblemente a la activación de canales ENaCs y K_{ATP} ya que el AMPc puede estar incrementando la [AMPc]_i.

El TEA a una concentración de 0.5 mM inhibe significativamente la corrientes activadas por 8-Br-AMPC y NH_4Cl , sin embargo, no se observan diferencias significativas de la corriente a potenciales positivos cuando se registra en solución con bajo Ca^{2+}_i . De lo anterior concluimos que Slo1 no forma parte de las corrientes activadas al aumentar el pHi e incrementar el AMPc y es importante resaltar que Slo1 es insensible a pHi y AMPc. No se realizaron los experimentos para conocer si los efectos del 8-Br-AMPC y NH_4Cl son aditivos o cooperativos, solo se observa que la corriente es mayor en presencia de los dos agentes que sólo con la alcalinización intracelular inducida con NH_4Cl , por lo que es posible que el AMPc y el pHi modulen al canal Slo3 de formas distintas. Se sabe que la sensibilidad a pH del canal Slo3 se debe al dominio carboxilo terminal citosolico, aun no se conoce el sitio de interacción del AMPc.

La adición de TEA 60 mM al medio extracelular inhibe el incremento generado por 8-Br-AMPC y NH_4Cl en la amplitud de la corriente que resta después de agregar amilorida y tolbutamida. Este resultado indica que en estas condiciones se activa el canal Slo3. Consistente con lo anterior, se observó una inhibición ~ 50 % sobre las corrientes de K^+ nativas restadas al adicionar Ba^{2+} 1 mM. El Ba^{2+} es el inhibidor más específico para Slo3 que se ha identificado en estudios de (Santi *et al*, datos no publicados) expresión heteróloga. La detección inmunológica de Slo3 en espermatozoides de ratón, la detección de expresión de Slo3 en células espermátogenicas y el registro

electrofisiológico de corrientes activadas por alcalinización intracelular y AMPc sugieren fuertemente que el canal Slo3 se encuentra de forma funcional en el espermatozoide de ratón.

7.2 Corrientes de Ca²⁺ tipo T en el espermatozoide testicular de ratón

Las corrientes de Ca²⁺ encontradas en el espermatozoide testicular de ratón son sensibles a mibefradil y nifedipina. Por esta razón, estas corrientes transitorias son generadas por canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo T. Aún cuando se había reportado su presencia en células espermatogénicas y que los estudios de inmunolocalización sugieren su presencia en el espermatozoide maduro, nunca se habían registrado canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo T en el espermatozoide. Por otra parte es necesario hacer más estudios para conocer que subunidades están involucradas.

VIII Perspectivas

8.1 Perspectivas para demostrar la participación de Slo3 en capacitación y/o RA

Las pruebas que se realizaron para la identificación de Slo3 en el espermatozoide indican la presencia del canal Slo3 en esta célula. De cualquier manera, hacen falta experimentos comprobatorios, como por ejemplo, registros en espermatozoides nulos para Slo3, que demostrarían que este canal está contribuyendo de forma importante a las corrientes registradas. Se observaría una corriente con características similares a la registrada en presencia de TEA 60 mM. También se podría estudiar si los espermatozoides del ratón nulo para Slo3 muestran alteraciones en los procesos de capacitación y/o RA. Actualmente el grupo de investigación coordinado por el Dr. Salkoff que realizó la expresión heteróloga en ovocitos del canal Slo3 está trabajando en la generación del ratón nulo. Nuestra colaboración con ellos nos permitirá estudiar

como el canal Slo3 participa en la fisiología del espermatozoide de ratón, la obtención de este genotipo permitirá realizar la comparación de las corrientes iónicas de espermatozoides que no expresan Slo3 con los espermatozoides nativos, descartando así la posibilidad de efectos inespecíficos generados por los inhibidores como el TEA y el Ba^{2+} .

Como control resta por probar el efecto del TEA sobre las corrientes que no se activan con AMPc y NH_4Cl . Según los datos experimentales, en ausencia de estos moduladores, la corriente que corresponde a Slo3 no contribuye de forma importante. Esperamos que TEA no tenga efectos significativos sobre la corriente control.

8.2 Perspectivas en la caracterización de canales de Ca^{2+} tipo T

Para la caracterización posterior de canales de Ca^{2+} se podrían aplicar diferentes concentraciones de Ni^{2+} para obtener una curva dosis respuesta y saber que tipo subunidades están involucradas. Esto sería posible haciendo uso de las diferentes IC_{50} de los distintos canales de Ca^{2+} presentes. Las IC_{50} s a Ni^{2+} de la subunidad Cav3.1 y 3.2 ya se han reportado por Lee *et al* (1999) y Lacinova *et al* (2000).

VIII Referencias

- ACEVEDO JJ, MENDOZA-LUJAMBIO I, DE LA VEGA-BELTRAN JL, TREVINO CL, FELIX R, DARSZON A.** K_{ATP} channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation *Dev Biol.* 2006 Jan 15;289(2):395-405. Epub 2005 Dec 15.
- ARNOULT C, KAZAM IG, VISCONTI PE, KOPF GS, VILLAZ M, FLORMAN HM.** Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation.
- ARNOULT, C., J. R. LEMOS, AND H. M. FLORMAN.** Voltage-dependent modulation of T-type calcium channel by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 16: 1593–1599, 1997.
- ARNOULT, C., R. A. CARDULLO, J. R. LEMOS, AND H. M. FLOR-MAN.** Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13004–13009, 1996.
- ARNOULT C, VILLAZ M, FLORMAN HM.** Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol.* 1998 Jun;53(6):1104-11.
- ASHCROFT, F. M. & ASHCROFT, S. J. H.** (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K^+ channels. *Cellular Signalling* 2, 197-214.
- AUSTIN, C. R., AND R. V. SHORT.** *Germ Cells and Fertilization.* Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1972.
- BABCOCK, D. F., M. M. BOSMA, D. E. BATTAGLIA, AND A. DARSZON.** Early persistent activation of sperm K_1 channels by the egg peptide speract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6001–6005, 1992.
- BARRET L, ARSAC P, VINCENT M, FAURE J, GARREL S, REYMOND F.** Evoked trigeminal nerve potential in chronic trichloroethylene intoxication.
- BELLVE AR, MILLETTE CF, BHATNAGAR YM, O'BRIEN DA** Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J Histochem Cytochem.* 1977 Jul;25(7):480-94.
- BELTRAN, C., A. DARSZON, P. LABARCA, AND A. LIEVANO.** A high-conductance voltage-dependent multistate Ca^{2+} channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Lett.* 338: 23–26, 1994.
- CARAFOLI, E** Calcium—a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels, *FEBS J.* 272 (2005) 1073–1089.
- CARLSON AE, WESTENBROEK RE, QUILL T, REN D, CLAPHAM DE, HILLE B, GARBERS DL, BABCOCK DF.** CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):14864-8. Epub 2003 Dec 1.
- CASTELLANO LE, TREVINO CL, RODRIGUEZ D, SERRANO CJ, PACHECO J, TSUTSUMI V, FELIX R, DARSZON A.** Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* 2003 Apr 24;541(1-3):69-74.
- DARSZON A, LOPEZ-MARTINEZ P, ACEVEDO JJ, HERNANDEZ-CRUZ A, TREVINO CL.** T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium.* 2006 Aug;40(2):241-52. Epub 2006 Jun 23.
- DARSZON A, NISHIGAKI T, WOOD C, TREVINO CL, FELIX R, BELTRAN C.** 2005. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol.* 243, 79-172.

DARSZON, A. S., LABARCA, P., NISHIGAKI, T. AND ESPINOSA, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Reviews* 79: 481-510.

DARSZON, A., A. LIEVANO, AND C. BELTRAN. Ion channels: key elements in gamete signaling. In: *Current Topics in Developmental Biology*, edited by R. A. Pedersen and G. P. Schatten. San Diego, CA: Academic, 1996, vol. 34, p. 117-167.

DEMARCO IA, ESPINOSA F, EDWARDS J, SOSNIK J, DE LA VEGA-BELTRAN JL, HOCKENSMITH JW, KOPF GS, DARSZON A, VISCONTI PE. Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation.

J Biol Chem. 2003 Feb 28;278(9):7001-9. Epub 2002 Dec 19.

FELIX R, SERRANO CJ, TREVINO CL, MUNOZ-GARAY C, BRAVO A, NAVARRO A, PACHECO J, TSUTSUMI V AND DARSZON A (2002) Identification of distinct K^+ channels in mouse spermatogenic cells and sperm. *Zygote* 10,183±188.

GILBERT., S. F. Fertilization: Beginning a new organism. *En: Developmental biology*, 4ta. ed (1994) Sinauer associates Inc. Sunderland Massachusetts. Pp 1211-158.

GONZALEZ MARTINEZ, M., AND A. DARSZON. A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* 218: 247-250, 1987.

GORELIK G, BORDA E, BACMAN S, CREMASCHI G, STERIN-BORDA L. Chagasic IgG stimulates phosphoinositide hydrolysis via neurotransmitter receptor activation: role of calcium. 1992 Sep;5(3):249-59.

GORELIK, J., GU, Y., SPOHR, H. A., SHEVCHUK, A. I., LAB, M. J., HARDING, S. E., EDWARDS, C. R., WHITAKER, M., MOSS, G. W., BENTON, D. C., SANCHEZ, D., DARSZON, A., VODYANOY, I., KLENERMAN, D., AND KORCHEV Y. E. Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a patch-clamp system. *Biophys. J.* 83: 3296-303, 2002.

GUERRERO, A., AND A. DARSZON. Evidence for the activation of two different Ca^{2+} channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 264: 19593-19599, 1989.

GUERRERO, A., SÁNCHEZ J. A. Y DARSZON A. Single channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique. *FEBS Lett.* 220, 295-298 (1987).

GWANYANYA A, AMUZESCU B, ZAKHAROV SI, MACIANSKIENE R, SIPIDO KR, BOLOTINA VM, VEREECKE J, MUBAGWA K. Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J Physiol.* 2004 Sep 15;559(Pt 3):761-76. Epub 2004 Jul 22.

HERNANDEZ-GONZALEZ EO, SOSNIK J, EDWARDS J, ACEVEDO JJ, MENDOZA-LUJAMBIO I, LOPEZ-GONZALEZ I, DEMARCO I, WERTHEIMER E, DARSZON A, VISCONTI PE. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem.* 2006 Mar 3;281(9):5623-33. Epub 2005 Dec 30.

HERNANDEZ-GONZALEZ EO, SOSNIK J, EDWARDS J, ACEVEDO JJ, MENDOZA-LUJAMBIO I, LOPEZ-GONZALEZ I, DEMARCO I, WERTHEIMER E, DARSZON A, VISCONTI PE. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem.* 2006 Mar 3;281(9):5623-33. Epub 2005 Dec 30.

HILLE, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

JOVINE L, DARIE CC, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. Zona pellucida domain proteins. *Annual Rev Biochem.* 2005;74:83-114.

KIRICHOK Y, NAVARRO B, CLAPHAM DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):737-40.

KIRICHOK Y, NAVARRO B, CLAPHAM DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):737-40.

KRAUSS RM, CHAIT A, STONE NJ. Soy protein and serum lipids. *N Engl J Med.* 1995 Dec 21;333(25):1715-6.

LACINOVA L, KLUGBAUER N, HOFMANN F. Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys.* 2000 Jun;19(2):121-36. Review.

LEE MG, MINN KW. Distally based free flap using retrograde arterial flow. *Plast Reconstr Surg.* 1999 Dec;104(7):2063-7.

LIEVANO, A., J. SANCHEZ, AND A. DARSZON. Single channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Dev. Biol.* 112: 235–257, 1985.

LITVIN TN, KAMENETSKY M, ZARIFYAN A, BUCK J, LEVIN LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15922-6. Epub 2003 Feb 27.

MAGLEBY KL. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol.* 2003 Feb;121(2):81-96. Review. No abstract available.

MUNOZ-GARAY C, DE LA VEGA-BELTRAN JL, DELGADO R, LA BARCA P, FELIX, R AND DARSZON, A (2001) Inwardly rectifying (K^+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234,261±274.

NISHIGAKI T, WOOD CD, SHIBA K, BABA SA, DARSZON A. Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *Biotechniques.* 2006 Aug;41(2):191-7.

O'TOOLE, C. M. B., ARNOULT, C., DARSZON, A., Steinhardt, R. A. and Florman, H. M. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molec. Biol. Cell.* 11: 1571-1584, 2000.

PEREZ-REYES E., Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 1998 Aug;30(4):313-8.

QUILL TA, REN D, CLAPHAM DE, GARBERS DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12527-31.

REN D, NAVARRO B, XU H, YUE L, SHI Q, CLAPHAM DE. A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science.* 2001 Dec 14;294(5550):2372-5

SANCHEZ JF, KRAUSE JE, CORTRIGHT DN. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience.* 2001;107(3):373-81.

SANTI CM, DARSZON A, HERNANDEZ-CRUZ A. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol.* 1996 Nov; 271(5 Pt 1):C1583-93.

SHANER NC, STEINBACH PA, TSIEN RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Meth* 2(12):905– 909

SCHREIBER M, SALKOFF L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J.* 1997 Sep;73(3):1355-63

SCHREIBER M, YUAN A, SALKOFF L. Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci.* 1999 May;2(5):416-21.

SCHREIBER, M., A. WEI, A. YUAN, J. GAUT, M. SAITO, AND L. SALKOFF. Slo3, a novel pH-sensitive K1channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 3509–3516, 1998.

TREVINO CL, FELIX R, CASTELLANO LE, GUTIERREZ C, RODRIGUEZ D, PACHECO J, LOPEZ-GONZALEZ I, GOMORA JC, TSUTSUMI V, HERNANDEZ-CRUZ A, FIORDELISIO T, SCALING AL, DARSZON A. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca²⁺ channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 2004 Apr 9;563(1-3):87-92.

WILLIAM A. CATTERALL, EDWARD PEREZ-REYES, TERRANCE P. SNUTCH AND JOERG STRIESSNIG International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels *Pharmacol Rev* 57:411-425, 2005