



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
[Departamento de Genética del Desarrollo y](#)
[Fisiología Molecular](#)

Implicaciones de la relación entre los
cambios del calcio/curvatura del flagelo en la
quimiotaxis del espermatozoide del erizo de
mar.

T E S I S

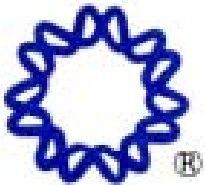
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO
DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Christopher David Wood.



CUERNAVACA, MORELOS 2008



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.


Agradecimientos


*A STORY IS READY ONLY
WHEN IT IS READY...*

Charles Zucker

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección conjunta de los Doctores Christopher Wood, Alberto Darszon y Takuya Nishigaki. A quienes agradezco su continuo interés, consejos y ejemplo de vida. La investigación se llevó a cabo en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular de Instituto de Biotecnología de la UNAM. Agradezco también el apoyo del CONACYT y la atmósfera de colaboración y entusiasmo que me brindaron los miembros del laboratorio.

Sandra C., Carmen M., Josué G., Karla G., y Adriana SM.

Gracias.

*A los colaboradores:
Dr. Gustavo Martínez.
Dr. Jorge Carneiro.
Dr. Gabriel Corkidi.
Gracias por su mirada biofísica.*

A la Dr. Alejandra Bravo y al Dr. Arturo Hernández por sus acertadas sugerencias durante las evaluaciones tutorales.

*Agradezco al comité de evaluación por su exhaustiva revisión del presente manuscrito.
Dr. Omar Pantoja
Dr. Luorival Possani.
Dr. Luis Vaca.
Dr. Ignacio López.
Dr. Christopher Wood*

ÍNDICE.

RESUMEN.	6
1 INTRODUCCIÓN.	7
2 ANTECEDENTES.	8
2.1 <i>La capacidad para nadar y reorientarse está determinada por el grado de desplazamiento de los microtúbulos dentro del axonema.</i>	8
2.2 <i>La capa externa del óvulo contiene moléculas que difunden y alteran el patrón de nado del espermatozoide.</i>	11
2.3 <i>Mecanismos intracelulares involucrados en la regulación del nado del espermatozoide.</i>	11
2.4 <i>El Ca^{2+} y la regulación de la movilidad del espermatozoide del erizo de mar.</i>	14
3 HIPÓTESIS.	20
<i>Las diferencias entre los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> y <i>L. pictus</i> en cuanto a su capacidad para experimentar quimiotaxis están determinadas por la relación entre el momento de dar la vuelta y su posición en el gradiente del speract.</i>	20
4 OBJETIVO GENERAL.	20
<i>Demostrar que la acumulación de los espermatozoides de <i>L. pictus</i> inducida por el speract es un fenómeno quimiotáctico e identificar las diferencias con respecto al comportamiento de los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i>.</i>	20
5 OBJETIVOS PARTICULARES	20
1. <i>Implementar el índice de quimiotaxis LECl para demostrar que la acumulación de los espermatozoides de <i>L. pictus</i> inducida por el speract se debe a una respuesta quimiotáctica.</i>	20
2. <i>Determinar la posición y dirección de los espermatozoides en el momento que experimentan los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el speract, y estudiar su participación en el desarrollo de una respuesta quimiotáctica.</i>	20
3. <i>Estudiar el impacto de la presencia del ácido niflúmico en la respuesta al speract.</i>	20
6 MÉTODOS.	21
6.1 <i>Extracción de gametos.</i>	21
6.2 <i>Materiales.</i>	21
6.3 <i>Incorporación del colorante Fluo-4 a los espermatozoides.</i>	21
6.4 <i>Microscopía de epifluorescencia en tiempo real.</i>	21
6.5 <i>Rastreo de espermatozoides.</i>	22
6.6 <i>Procesamiento de Imágenes.</i>	23
6.7 <i>Determinación del centro del gradiente</i>	24
6.8 <i>Implementación del índice de quimiotaxis LECl.</i>	24
6.9 <i>Clasificación de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el speract.</i>	25
7 RESULTADOS.	26
7.1 <i>El cambio en el patrón de nado de espermatozoides de <i>L. pictus</i> inducido por el speract depende de su posición con respecto al centro del gradiente.</i>	30
7.2 <i>Papel del speract en la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.</i>	33

7.3 La ocurrencia de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides de <i>L. pictus</i> está correlacionada con la dirección del nado y su posición con respecto al centro del gradiente.....	38
7.4 La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de <i>L. pictus</i> requiere Ca^{2+} extracelular.	41
7.5 Los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> experimentan cambios de movilidad similares a los espermatozoides de <i>L. pictus</i> durante la primera fase, pero carecen de la segunda y tercera fase.....	42
7.6 Los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> no experimentan una respuesta quimiotáctica bajo las mismas condiciones donde los espermatozoides de <i>L. pictus</i> si lo hacen.	43
7.7 Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentados por los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> después de un periodo de nado hacia o desde el centro del gradiente ocurren con la misma frecuencia.	44
7.8 La ocurrencia de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ está correlacionada con la dirección del nado de los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> y su posición con respecto al gradiente.....	45
7.9 La presencia del ácido niflúmico altera el cambio en el patrón de nado inducido por el speract en ambas especies e inhibe la quimiotaxis de los espermatozoides de <i>L. pictus</i>	47
8 DISCUSIÓN.	50
8.1 El papel del speract en la regulación de la movilidad del espermatozoide del erizo de mar, y sus implicaciones en la respuesta quimiotáctica.	50
8.2 El speract desencadena un sistema de generación de vueltas pronunciadas que es regulado por la información posicional que establece el gradiente del quimioatrayente.	52
8.3 El papel del Ca^{2+} en la respuesta quimiotáctica.	56
8.4 El espermatozoide posee un sistema de navegación que requiere la coordinación entre periodos de viraje (vueltas pronunciadas) y periodos de nado recto que se asemeja al de las bacterias.....	57
9 CONCLUSIONES.	58
10 PERSPECTIVAS.	60
11 MATERIAL SUPLEMENTARIO	61
12 BIBLIOGRAFÍA.....	64

RESUMEN.

La generación de la vida mediante la reproducción sexual depende de la comunicación entre el óvulo, el espermatozoide y el ambiente que los rodea. El óvulo del erizo de mar secreta factores, llamados péptidos activadores del espermatozoide (SAP, por sus siglas en inglés), que alteran el patrón de nado del espermatozoide [2]. Los SAPs se unen a sus receptores en el espermatozoide y promueven cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , Na^+ , AMPc y GMPc. Estos cambios generan como consecuencia una respuesta estereotípica en la movilidad del espermatozoide, principalmente una serie de vueltas intercaladas con periodos de nado recto, en donde las vueltas se generan por fluctuaciones transitorias en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). En algunas especies de erizo de mar, por ejemplo *Arbacia punctulata*, los cambios en la movilidad producen una respuesta quimiotáctica. Sin embargo, otras especies, por ejemplo *Strongylocentrotus purpuratus*, no experimentan quimiotaxis bajo condiciones experimentales equivalentes, aunque el patrón de movimiento inducido por los SAPs es muy parecido. En el presente trabajo se comparan dos especies de espermatozoides, *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus* que responden al mismo agonista, un SAP llamado speract. Desarrollamos un sistema de microscopía de fluorescencia mediante el cual podemos generar gradientes de speract casi instantáneamente empleando una versión enjaulada de este compuesto combinado con el uso de cables ópticos de diferentes diámetros (0.2 – 6 mm). Encontramos, por vez primera, que la presencia de un gradiente de speract induce incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulados en tiempo y espacio que desencadenan una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides de *L. pictus*. Bajo éstas condiciones experimentales no observamos una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides de *S. purpuratus*. Decidimos investigar si las diferencias que determinan que un espermatozoide experimente quimiotaxis, o no, tienen su origen en cambios en la relación entre el dinámica los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante las vueltas. Si una vuelta es muy corta o muy larga, el espermatozoide terminará en una ubicación menos favorable durante la fase de nado recto. Para probar ésta hipótesis, empleamos el ácido niflúmico, un bloqueador de canales de Cl^- regulados por Ca^{2+} que altera la cinética de las fluctuaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [3]; encontramos que en su presencia los espermatozoides de *L. pictus* pierden la respuesta quimiotáctica. La caracterización de la regulación fina de la dinámica de Ca^{2+} y sus implicaciones en la movilidad, proporcionará evidencia de los mecanismos que regulan y dirigen la respuesta quimiotáctica.

1 INTRODUCCIÓN.

La generación de un individuo mediante la reproducción sexual depende de la comunicación adecuada entre el espermatozoide, el óvulo, y el ambiente que los rodea. Este diálogo a distancia maximiza las probabilidades del encuentro ovulo-espermatozoide. La difusión de componentes provenientes de la capa externa del óvulo establece un gradiente de concentración que el espermatozoide homólogo reconoce, y resulta en su relocalización hacia el centro del gradiente con la finalidad de establecer el origen de la fuente, entiéndase el óvulo [2, 4]. Este proceso denominado quimiotaxis está distribuido de manera amplia entre diferentes especies de organismos marinos y mamíferos [4-6]. Sin embargo, los mecanismos celulares y las diferentes estrategias reproductivas no se conocen del todo, en particular los mecanismos que redirigen el nado del espermatozoide hacia el óvulo.

La movilidad es una propiedad fundamental de muchas células. Una variedad de estas se impulsan gracias a cilios y flagelos cuya estructura está muy conservada. El espermatozoide es una de estas células, su flagelo le permite nadar y cumplir con su objetivo principal, fecundar al óvulo. El patrón de movimiento y la forma del flagelo del espermatozoide no son constantes, cambian dinámicamente dependiendo del estadio en el que se encuentren durante el proceso de preparación para fecundar al óvulo. Los espermatozoides modulan el batido del flagelo para controlar la dirección de su nado.

2 ANTECEDENTES.

2.1 La capacidad para nadar y reorientarse está determinada por el grado de desplazamiento de los microtúbulos dentro del axonema.

El axonema es el aparato interno que mueve al flagelo y está constituido por un par central de microtúbulos rodeado por 9 pares externos, **Figura 1A, B**. Cada par externo está integrado por un *túbulo a*, que tiene una forma circular en una vista transversal, y un *túbulo b*, que tiene forma de 'c' y comparte una parte de la pared del *túbulo a*. Todos los microtúbulos del axonema están contruidos a partir de heterodímeros de α y β -tubulina y forman protofilamentos de $\sim 4\text{nm}$ de diámetro que corren a lo largo de los microtúbulos [7, 8]. Tanto el par central como los *túbulos a* contienen 13 protofilamentos, mientras que el *túbulo b* contiene 10 u 11 protofilamentos. Dentro de los protofilamentos los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina se repiten cada 8 nm; este periodo es importante debido a que proporciona sitios de interacción con estructuras asociadas entre las que destacan: los brazos de dineína externos e internos, fibras de nexinas y las estructuras radiales, entre otras [7-9]. Los brazos de dineína (tanto externos como internos) se extienden desde el *túbulo a* de un par al *túbulo b* del par adyacente a intervalos de 24 nm a lo largo del doblete. La composición de ambos brazos de dineína es compleja, contienen más de tres cadenas pesadas con actividad ATPasa ($\text{PM} > 400,000$), y varias cadenas intermedias y ligeras. Las fibras de nexina son fibras que conectan el *túbulo a* de un doblete al *túbulo b* del doblete adyacente a intervalos de 96 nm [7-9]. Las ligas radiales se extienden del *túbulo a* de cada doblete hacia el par central del axonema. El axonema se desarrolla a partir del cuerpo basal que en el espermatozoide se encuentra en la base de la cabeza; en esta región el desplazamiento entre pares adyacentes de microtúbulos está restringido [7-9].

El desplazamiento activo de los microtúbulos responsables del movimiento flagelar ocurre entre pares adyacentes y es propiciado por la hidrólisis de ATP mediada por la actividad ATPasa de las cabezas de los brazos de dineína [7-9]. La generación de la fuerza de este movimiento tiene una polaridad debido a que los brazos de dineína unidos al *túbulo a* de un doblete siempre empujan el doblete

adyacente en dirección de la base a la punta del axonema [7-9]. Concomitante con cada ciclo de unión e hidrólisis de ATP, cada brazo de dineína experimenta un ciclo de unión y desunión del *túbulo b* del doblete adyacente, causando que el doblete al cual el brazo de dineína está fijo se desplace sobre la superficie del doblete opuesto [7-9]. Dentro del axonema hay estructuras que generan una resistencia a este desplazamiento (nexinas, estructuras radiales, brazos de dineínas) que promueven la generación de plegamientos dentro del axonema, **Figura 1C**. Dado que los brazos de dineína producen fuerza en una sola dirección, es esencial que la actividad de los brazos sea controlada alrededor del eje de los dobletes externos [7]. Por ejemplo, en un flagelo que bate en el plano, el desplazamiento activo debe ocurrir de manera alternativa primero en una mitad del axonema para producir plegamiento en una región, y luego en la otra mitad para ocasionar que el flagelo se doble en dirección opuesta [7]. En la **Figura 1 C**, se presentan dos filamentos flexibles (como los pares de microtúbulos externos) antes **(i)** y después de experimentar un desplazamiento entre ellos **(ii, iii y iv)**. Se puede observar que la resistencia al desplazamiento entre estos dos filamentos promueve la generación de plegamientos. Si hay una región de resistencia al desplazamiento en un extremo se forma un plegamiento entre los dos filamentos **(iii)**. Cuando hay regiones de resistencia en ambos extremos a la región de generación de fuerza se forman regiones de plegamiento en direcciones opuestas en cada extremo **(iv)**.

La propagación del batido flagelar ocurre a través de una onda sinusoidal que se origina en una región cercana a la base de la cabeza y se propaga al extremo final del flagelo. Esta onda está constituida por una curva principal (P) y una curva reversa (R), **Figura 1D**. La curva P se desarrolla en la parte externa de la trayectoria circular que describe el espermatozoide mientras se desplaza; la curva R se desarrolla en la parte interna. En el espermatozoide del erizo de mar, el flagelo bate 40 veces por s, la transición de la curva P a curva R determina cada batido flagelar [10, 11].

La dirección y el control del nado del espermatozoide dependen de las propiedades de las curvas P y R. Cuando estas son iguales la onda sinusoidal del batido del flagelo es simétrica, por consiguiente el espermatozoide nada en línea recta; cuando la curva P es diferente a la curva R la onda sinusoidal es asimétrica, lo que promueve que el espermatozoide experimente una trayectoria de nado

curva. Así, la capacidad para nadar y reorientarse está determinada por la simetría de la onda sinusoidal del flagelo causada por el grado de desplazamiento de los microtúbulos dentro del axonema.

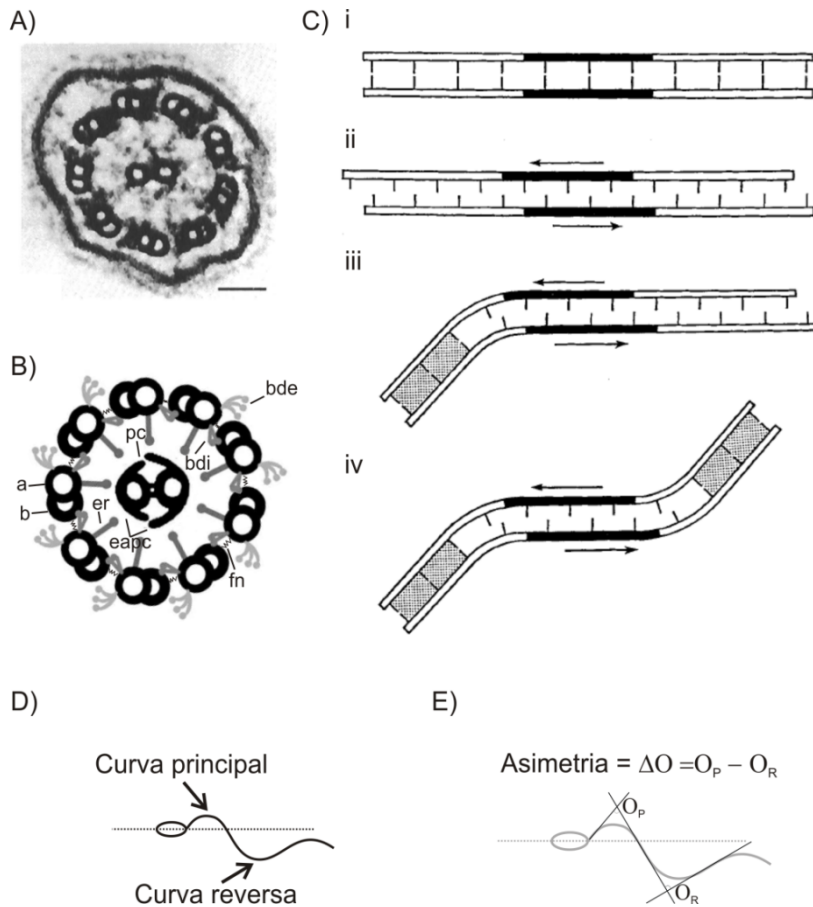
FIGURA 1. El desplazamiento de los microtúbulos del axonema determina el grado de simetría del flagelo.

A) Micrografía electrónica de una sección transversal del flagelo de *Clamidomonas* visto de la base a la punta, Barra=0.05µm.

B) Diagrama de A. Se muestran los *túbulos a* y *b*; *bde* y *bdi*, brazos de dineína externos e internos; *fn*, fibras de nexina; *er*, estructuras radiales; *pc*, par central; *eapc*, estructuras asociadas al par central.

C) La resistencia al desplazamiento entre dos filamentos promueve la generación de plegamientos; **i**, filamentos antes de desplazarse; **(ii, iii, iv)**, La generación de fuerza en las regiones oscuras conduce al desplazamiento relativo de los filamentos en la dirección ilustrada por la flecha, las regiones grises representan regiones que se oponen al desplazamiento de los filamentos.

D) Diagrama que ilustra las curvas principal y reversa. **E)** El valor de asimetría se obtienen de la diferencia entre los ángulos θ_P y θ_R . **A), B)** y **C)** se modificaron de [7] y [12].



La intersección entre dos rectas tangentes a la curva P determina el ángulo θ_P ; a su vez la intersección entre dos rectas tangentes a la curva R determina el ángulo θ_R . La diferencia entre los ángulos θ_P y θ_R , es el valor de asimetría del flagelo $\Delta\theta = \theta_P - \theta_R$ [11], **Figura 1E**. Por evidencia experimental en espermatozoides desmembrados (ver sección 2.4 para detalle de la técnica), sabemos que el valor promedio de los ángulos θ_P y θ_R se mantiene constante durante y entre cada batido flagelar $(\theta_P + \theta_R)/2 = C$ [11]. Lo anterior indica que ambos ángulos son mutuamente dependientes, es decir, si θ_P aumenta θ_R tiene que disminuir. Durante un movimiento circular la curva $P \neq$ curva R, por consiguiente $\theta_P \neq \theta_R$ y $\Delta\theta \neq 0$. En

los periodos de nado recto, la curva P = curva R, $\theta_P = \theta_R$, y $\Delta\theta = 0$. Así, entre más grande es la diferencia entre θ_P y θ_R mayor es el valor de asimetría.

2.2 La capa externa del óvulo contiene moléculas que difunden y alteran el patrón de nado del espermatozoide.

La cubierta externa del óvulo del erizo de mar (la gelatina), contiene péptidos pequeños llamados péptidos activadores del espermatozoide (SAP por sus siglas en inglés). La difusión de estas moléculas solubles establece un gradiente de concentración que inducen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática a iones como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , y Cl^- . Estos cambios alteran el metabolismo celular y el patrón de nado de los espermatozoides (entiéndase vueltas pronunciadas intercaladas con periodos de nado recto, [6]) favoreciendo el encuentro entre estos dos gametos, **Figura 2**. La primera demostración de que los SAP alteran la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (determinada en una población celular) provino del trabajo de Schackmann y Chock [13], empleando speract, el primer SAP identificado, que estimula cambios en la movilidad de los espermatozoides de *S. purpuratus*. Posteriormente se encontró que el resact, otro SAP que estimula una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides de *A. punctulata*, también induce alteraciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [1, 14]. Es importante mencionar que en ambos casos el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular.

2.3 Mecanismos intracelulares involucrados en la regulación del nado del espermatozoide.

Una vez que el SAP se une a su receptor promueve la activación de la enzima guanilato ciclasa situada en la membrana del flagelo del espermatozoide que favorece un incremento en los niveles de GMPc; el cual se va a unir a un canal de K^+ regulado por GMPc (Tetra-KCNG) [15-18], **Figura 3**. Lo anterior promueve la apertura del canal y la salida de K^+ a favor de su gradiente electroquímico desplazando el potencial de membrana (E_m) a un valor más negativo (hiperpolarización) [18-21].

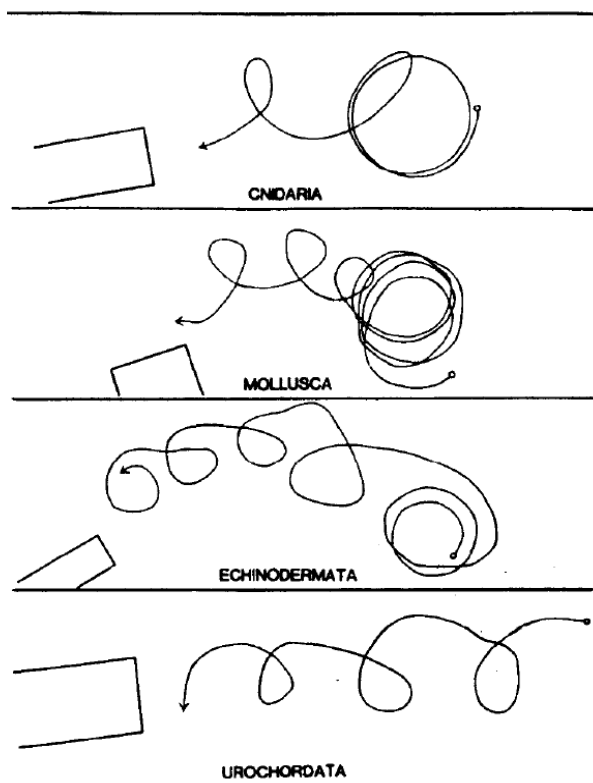


FIGURA 2. Comportamiento de los espermatozoides de organismos marinos en la presencia de moléculas quimioatrayentes. Trayectorias típicas de espermatozoides de moluscos, cnidaria, equinodermos y urocordados. En todos los casos los espermatozoides experimentan un cambio en el patrón de nado conformado por vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto. Los rectángulos representan la punta de una micropipeta que contiene la gelatina del óvulo ó extractos de ésta. (proveniente de [6]).

Esta hiperpolarización induce [22]:

1. Una disminución transitoria en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por un intercambiador $Na^+/Ca^{2+} - K^+$.
2. La alcalinización del medio intracelular debida a la activación de un intercambiador Na^+/H^+ . El aumento en el pH intracelular disminuye el nivel de GMPc inhibiendo (mediante defosforilación) la actividad de guanilato ciclasa y la activación de la fosfodiesterasa 5.
3. La activación de la adenilato ciclasa que causa un incremento en la $[AMPc]$.

Posterior a esta hiperpolarización ocurre una re-polarización favorecida por la activación de un canal regulado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (SpHCN). Esta re-polarización promueve un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Evidencias farmacológicas, junto con la cinética de cambios en el potencial de membrana (E_m), sugieren la participación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) en este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ [21, 23, 24].

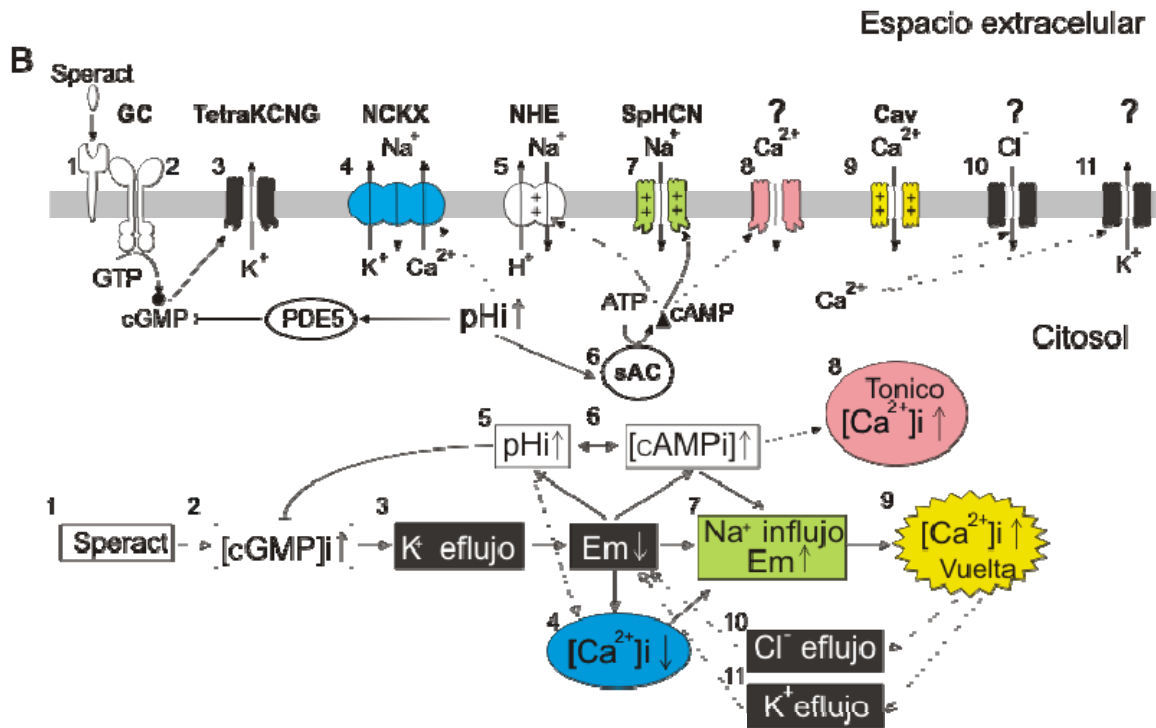


FIGURA 3. Eventos moleculares desencadenados tras la unión del SAP speract a su receptor. Las proteínas involucradas son 1, el receptor del speract; 2, guanilato ciclasa (GC); 3, canal de K⁺ regulado por GMPc (TetraKCNG); 4, intercambiador Na⁺/Ca²⁺ - K⁺ (NCKX); 5, intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE); 6, adenilato ciclasa soluble (ACs); 7, canal de K⁺ poco selectivo (P_{K+}/P_{Na+} ~ 5, bajo condiciones fisiológicas entra Na⁺) regulado por hiperpolarización y nucleótido cíclico del espermatozoide (SpHCN); 8, canal de Ca²⁺ regulado por AMPc; 9, canales de Ca²⁺ regulados por voltaje (Cav); 10, canales de Cl⁻ regulados por Ca²⁺ (CaCC); canales de K⁺ regulados por Ca²⁺ (CaKC). La secuencia de los números no refleja una sucesión temporal (de [2]).

La re-polarización de la membrana permite la apertura de los canales de Cav que, transcurridos ~ 200 ms tras la unión del SAP a su receptor, favorecen la entrada de Ca²⁺ extracelular conduciendo a la membrana del espermatozoide a un estado despolarizado [21]. Posteriormente a estos eventos se desencadena una serie de fluctuaciones rápidas y transitorias en la [Ca²⁺]_i que son determinantes para la regulación de la movilidad del espermatozoide [3, 25]. El análisis de espermatozoides individuales inmovilizados en un cubreobjetos reveló que hay al menos dos vías de entrada de Ca²⁺; una responsable de los incrementos transitorios y otra responsable de un aumento sostenido [23]. El mecanismo y papel que desempeña el incremento tónico en la regulación de la movilidad no se conoce. Son las fluctuaciones en la [Ca²⁺]_i las que promueven cambios en la curvatura del flagelo que, a su vez, se reflejan en cambios en el patrón de nado de los espermatozoides [3, 24, 26].

2.4 El Ca^{2+} y la regulación de la movilidad del espermatozoide del erizo de mar.

En 1979 C. J. Brokaw demostró que es posible mantener el batido del flagelo aún después de eliminar la membrana plasmática con un tratamiento con detergentes suaves [9]. Al colocar a los espermatozoides sin membrana en un medio que contenía ATP y Ca^{2+} encontró que el flagelo continuaba batiendo. Al variar la concentración de Ca^{2+} presente en el medio observó que el grado de la asimetría del flagelo dependía directamente de la concentración de este catión en el medio. Niveles altos de Ca^{2+} indujeron un aumento en la asimetría mientras que bajas concentraciones promovieron una disminución. Estudios de microscopía electrónica apoyados con estudios del plegamiento del flagelo han mostrado que los brazos de dineína presentes en los dobletes de microtúbulos 7 y 3 (ó 4) son los responsables de la formación de las curvas P y R, respectivamente [27, 28]. Altas concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhiben la formación de la curva R e incrementan la asimetría del flagelo al permitir una disminución de la actividad de las dineínas en el doblete # 3 [11]. Contrastantemente la actividad de las dineínas presentes en el doblete #7 no es influenciada por Ca^{2+} [11].

Como mencioné anteriormente la cubierta externa de óvulo del erizo de mar contiene SAPs que difunden y establecen gradientes de concentración que inducen cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ver **Figura 2**. Así mismo, presenté evidencia de que al exponer los espermatozoides de varias especies marinas experimentan un cambio en el patrón de nado caracterizado por vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto, ver **Figura 3**. Mencioné que la quimiotaxis requiere de la presencia de Ca^{2+} extracelular, ya que al faltar este catión las vueltas pronunciadas no ocurren y por tampoco la respuesta quimiotáctica. Así, los datos anteriores hacen evidente una relación entre los niveles de Ca^{2+} , los cambios en la asimetría del flagelo, el patrón de nado del espermatozoide y el proceso de fecundación *per-se*, mediante un mecanismo regulado por el establecimiento de gradientes de concentración de moléculas secretadas por el óvulo.

La evidencia de que el Ca^{2+} regula directamente los cambios de movilidad se obtuvo gracias al desarrollo de los compuestos enjaulados (versiones foto-activables de que tienen una afinidad disminuida a su molécula blanco) y los sistemas para tomar imágenes fluorescentes con alta resolución temporal. En caso

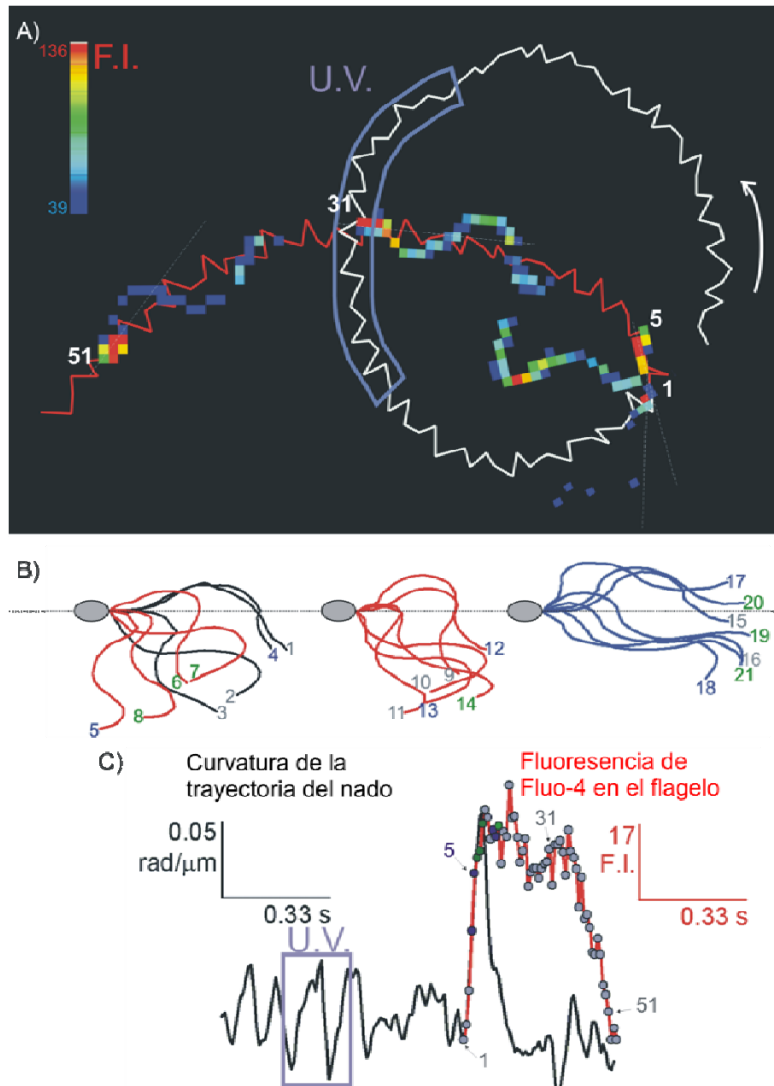
de los sistemas de microscopía de fluorescencia, estos compuestos enjaulados resuelven el problema de la perturbación del medio al añadir un compuesto bioactivo y por consiguiente la salida de foco de las células en cuestión.

FIGURA 4. Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ regulan el nado del espermatozoide.

A) Imágenes de fluorescencia que ilustran una fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ reportada con el colorante Fluo-4. La línea roja indica la trayectoria del espermatozoide durante la fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$, y la línea blanca es la trayectoria previa. La caja morada indica la foto-activación del speract enjaulado (200 ms UV). La flecha muestra la dirección del nado. La barra de color ilustra la fluorescencia después de hacer la substracción del fondo. 1, 5, 31 y 51 indican imágenes seleccionadas; el intervalo entre imágenes sucesivas (1, 2, ..., n) es ~8 ms.

B) Forma del flagelo del espermatozoide mostrado en A) en relación al eje de la cabeza: Los colores negro, rojo y azul representa la posición y forma del flagelo antes, durante y al finalizar la fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$, respectivamente. Los números 1, 2, 3, ..., 20 corresponden imágenes sucesivas (120 imágenes / s). Los números de color indican batidos sucesivos (gris representa los batidos 1,4 y 7; el verde representa 2, 5 y 8; el azul representa 3, 6 y 9).

C) Curvatura de la trayectoria del nado (trazo negro). El trazo rojo muestra en el promedio de la fluorescencia de Fluo-4 del flagelo durante la fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (1.4 s). La caja morada corresponde al flash UV. Los números indican las imágenes seleccionadas en A). (De [2]).



El desarrollo del resact y el speract enjaulados [14, 29] permitió dilucidar el papel que desempeñan las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ desencadenadas por los SAPs en la movilidad. El uso de un gradiente de luz para foto-activar el SAP en cuestión genera un gradiente de concentración de la molécula foto-activada [25]. La liberación de resact enjaulado en la presencia de los espermatozoides de *A. punctulata* desencadena un tren de fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ donde cada fluctuación se acompaña de una vuelta pronunciada en la trayectoria de nado; cada

vuelta esta intercalada con periodos de nado recto [25]. En estos estudios la generación de un gradiente de concentración de resact promovió la acumulación de espermatozoides hacia regiones de alta concentración del agonista.

Los espermatozoides de *S. purpuratus* experimentan procesos intracelulares similares a los de *A. punctulata*, al ser estimulados con su SAP homólogo [3], **Figura 4**. La foto-activación del speract enjaulado promueve cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, donde cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ está asociado a una vuelta pronunciada (**Figura 4 A**) ocasionada por un incremento en la asimetría del flagelo que se refleja en un aumento en la curvatura de la trayectoria de nado del espermatozoide, **Figura 4 B y C**. Posterior a cada vuelta pronunciada hay un periodo de nado recto (disminución de la curvatura de la ruta) que no necesariamente sigue la cinética de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$, **Figura 4 C**. Una diferencia notable entre los espermatozoides de *S. purpuratus* y *A. punctulata* es que los primeros no se acumulan al ser expuestos a su correspondiente SAP, el speract, o bien a extractos provenientes de la gelatina del óvulo. **Figura 5**. De esta manera tenemos dos especies de espermatozoides que experimentan respuestas intracelulares similares cuando son estimulados por su correspondiente SAP que resultan en modificaciones similares en la movilidad, aunque solo los espermatozoides de *A. punctulata* desarrollan quimiotaxis, **Figura 5**. Por tanto, es posible que la regulación fina de la dinámica de cambio de la $[Ca^{2+}]_i$ y su efecto en la regulación de la movilidad del flagelo tenga implicaciones directas en el mecanismo para llegar al óvulo.

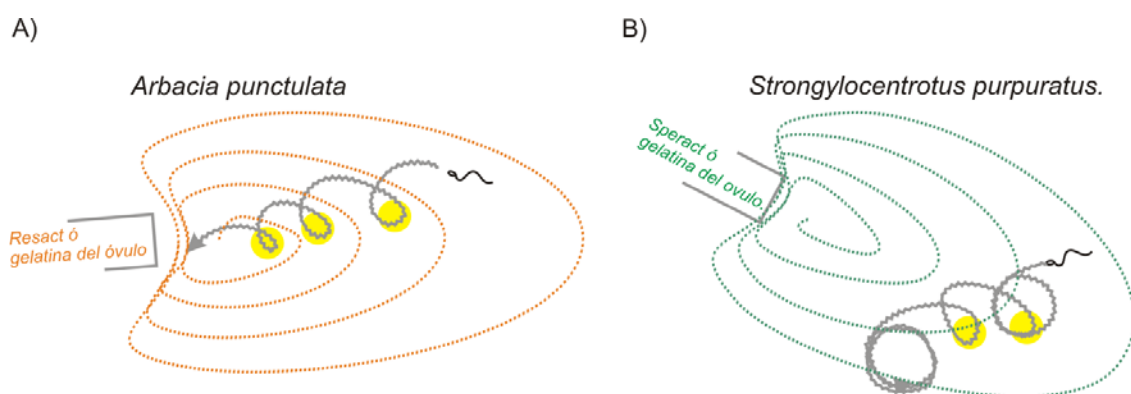


FIGURA 5. Espermatozoides de *A. punctulata* y *S. purpuratus* estimulados con moléculas provenientes del óvulo que alteran la movilidad. En ambas especies las vueltas pronunciadas seguidas del nado recto son características del cambio en el patrón de nado inducido por sus respectivos SAPs. **A)** Estos cambios en la movilidad tienen como consecuencia una trayectoria hacia la fuente del quimioatrayente en los espermatozoides de *A. punctulata*, fenómeno conocido como quimiotaxis. **B)** Los espermatozoides de *S. purpuratus* no desencadenan una

respuesta quimiotáctica. Cada círculo amarillo representa la posición del espermatozoide cuando experimenta una fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$.

La separación evolutiva que existe entre los erizos de mar *A. punctulata* y *S. purpuratus* (~160 m.a.) [30, 31], complica una comparación directa de los mecanismos que determinan que un espermatozoide experimente una respuesta quimiotáctica; aunado a esto el SAP que emplean es ligeramente diferente. Dado lo anterior decidimos hacer una comparación entre espermatozoides filogenéticamente más cercanos que respondan al mismo SAP. Tal es el caso de *L. pictus* y *S. purpuratus*, donde ambos responden al speract. Recientemente se demostró que la foto-activación del speract enjaulado promueve una acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* (Wood, datos no publicados) **Figura 6**.

La alteración de la cinética de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ con el ácido niflúmico, un inhibidor de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , conduce a cambios evidentes en la movilidad de los espermatozoides de *S. purpuratus* [3]. La exposición al speract en presencia de ácido niflúmico incrementa la amplitud de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (F_p/F_b , donde F_p es el pico de la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 para cada fluctuación en el flagelo, y F_b es la intensidad de fluorescencia basal en el flagelo al inicio de la fluctuación); el $t_{1/2}$ de incremento; el $t_{1/2}$ de disminución; el grosor del pico a la altura media; y el intervalo entre picos sucesivos [3, 23]. Lo anterior tuvo repercusión directa en la movilidad [3]. De las 182 fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ analizadas 172 estaban correlacionadas con incrementos en la curvatura de la trayectoria del nado del espermatozoide que reflejan vueltas pronunciadas. El estudio de estos incrementos en la curvatura de la trayectoria reveló que la presencia del ácido niflúmico altera los parámetros mencionados anteriormente de manera similar a lo que lo hace en los parámetros de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ [3]. Al exponer a los espermatozoides de *L. pictus* al speract en presencia del ácido niflúmico encontramos que la acumulación inducida por la pura presencia del speract no ocurre, **Figura 6**.

Número de espermatozoides de *L. pictus* en el campo.

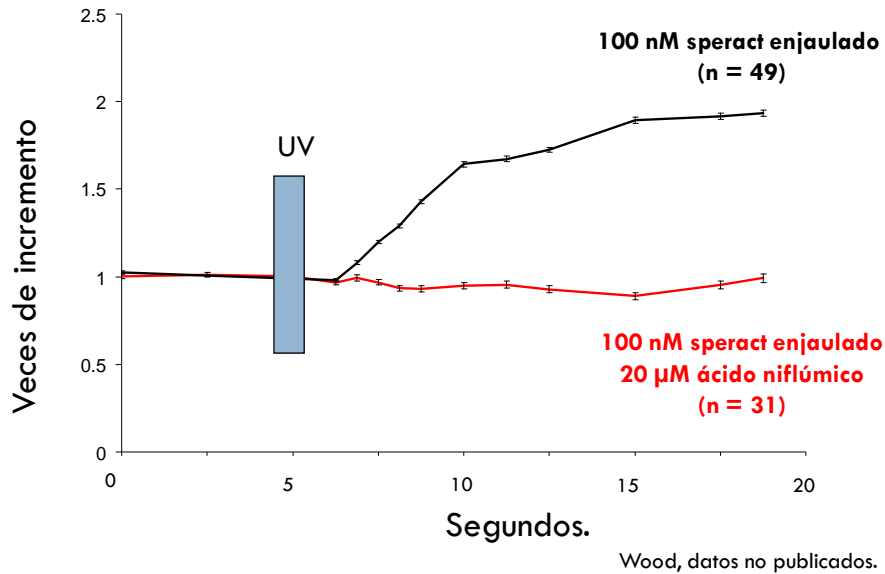


FIGURA 6. El speract induce la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus*. Cuantificación del aumento de cabezas de espermatozoides de *L. pictus* presentes en el campo tras la liberación de 100 nM de speract enjaulado con un flash de luz UV de 200 ms generando un gradiente de concentración con el valor máximo en el centro del campo. El número de cabezas se duplica tras la liberación del speract, la aplicación de 20-40 μM de ácido niflúmico elimina la acumulación de espermatozoides (Wood C, datos no publicados).

La simple acumulación de espermatozoides no es una demostración directa de quimiotaxis, ya que existen fenómenos como la quimiocinesis y/o el atrapamiento que pueden estar ocurriendo [6, 32]. La quimiocinesis es una alteración de la movilidad de las células sin necesidad de que ocurra un nado dirigido al centro de la fuente de la molécula agonista. El atrapamiento también es una alteración de la movilidad que ocasiona cambios en el patrón del nado que pueden resultar en una acumulación pero que no es debida a un nado dirigido a la fuente. Para demostrar que el speract induce quimiotaxis en los espermatozoides de *L. pictus* es necesario la implementación de un índice de quimiotaxis. El índice de la ecuación lineal de la quimiotaxis (LECI) (del inglés, "linear equation chemotaxis index") está probado y aceptado [33]. Yoshida y sus colaboradores desarrollaron este índice para cuantificar la quimiotaxis de los espermatozoides de ascidia [33]. En el presente trabajo implementamos LECI para determinar si la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* se debe a quimiotaxis. Demostramos por vez primera que el speract induce quimiotaxis en los espermatozoides de *L. pictus*, y no en los espermatozoides de *S. purpuratus* bajo las

mismas condiciones experimentales. Caracterizamos el comportamiento de nado de los espermatozoides de *L. pictus* antes y después de ser estimulados por el speract y demostramos que, en esta especie, la mayoría de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ ocurren después de que el espermatozoide experimenta un periodo de alejamiento del centro del gradiente. Presentamos evidencia que la presencia del ácido niflúmico destruye la respuesta quimiotáctica inducida por el speract en los espermatozoides de *L. pictus*.

3 HIPÓTESIS.

Las diferencias entre los espermatozoides de *S. purpuratus* y *L. pictus* en cuanto a su capacidad para experimentar quimiotaxis están determinadas por la relación entre el momento de dar la vuelta y su posición en el gradiente del speract.

4 OBJETIVO GENERAL.

Demostrar que la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* inducida por el speract es un fenómeno quimiotáctico e identificar las diferencias con respecto al comportamiento de los espermatozoides de *S. purpuratus*

5 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1. Implementar el índice de quimiotaxis LECI para demostrar que la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* inducida por el speract se debe a una respuesta quimiotáctica.**
- 2. Determinar la posición y dirección de los espermatozoides en el momento que experimentan los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el speract, y estudiar su participación en el desarrollo de una respuesta quimiotáctica.**
- 3. Estudiar el impacto de la presencia del ácido niflúmico en la respuesta al speract.**

6 MÉTODOS.

6.1 Extracción de gametos.

Los espermatozoides de *L. pictus* y *S. purpuratus* (Marinus Inc, Pamanes S. A. de C.V.) se obtuvieron mediante inyección intracelómica de una solución 0.5 M de KCl, colectados de los gonatoporos y almacenados en hielo hasta su uso.

6.2 Materiales.

El Agua de Mar México pH: 8 contiene (en mM): NaCl 486, CaCl₂ 10, MgCl₂ 26, KCl 10, MgSO₄·7H₂O 30, Hepes 10, NaHCO₃ 2.5, EDTA (Na²⁺) 0.1. El Agua de Mar México pH: 7 contiene lo mismo que el Agua de Mar México pH: 8 pero con 1 mM de CaCl₂. El agua de mar cero Ca²⁺ es Agua de Mar México pH: 8 sin Ca²⁺. El Fluo-4 AM y el ácido plurónico F-127 fueron de Molecular Probes, Inc.; el ácido niflúmico fue de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Edo de México, México); el [Ser5; nitrobenzyl-Gly6]speract (el speract enjaulado) se sintetizó como se describe en [29].

6.3 Incorporación del colorante Fluo-4 a los espermatozoides.

Los espermatozoides secos de *S. purpuratus* se suspendieron en 10 volúmenes de Agua de Mar México pH: 7 con 0.2 % de ácido plurónico F-127 agua/vol y 20 μM de Fluo-4 AM e incubados 2 horas a 15 °C. Posteriormente, se centrifugaron durante 8 min a 1,000 g y 4 °C para lavar el exceso de colorante y se re-suspendieron en el volumen original de Agua de Mar México pH: 7 y se almacenaron en hielo protegidos de la luz hasta su uso. El procedimiento de cargado para los espermatozoides de *L. pictus* fue el mismo con la diferencia que éstos no se lavaron debido a que son más sensibles al estrés ocasionado por la centrifugación lo que conlleva a una viabilidad disminuida.

6.4 Microscopía de epifluorescencia en tiempo real.

Los cubreobjetos se sumergieron en una solución 0.1 % agua/etanol de polihema (un antiadherente que evita que las células se peguen al cubreobjetos), se secaron con aire caliente para evaporar el solvente, se lavaron y se montaron en una

cámara reusable ajustable a un controlador de temperatura bipolar (TC-202, Medical Systems Corp.). La placa se mantuvo a una temperatura constante de 15 °C y se colocó en un microscopio invertido (Eclipse TE 300; Nikon). Las imágenes se colectaron a través de un objetivo de fluorescencia (Plan Fluor) 40x 1.3 NA empleando la combinación de filtros adecuada (ex, HQ470/40x; DC, 505DCXRU) y se registraron mediante una cámara EMCCD (DV887, Andor iXon). Se empleó un diodo emisor de luz (LED) Cían # LXHL-LE5C (Lumileds Lighting LLC, San Jose, USA) conectado a un controlador estroboscópico como fuente de iluminación. El LED se montó en un cubo (FlashCube40) ensamblado con un espejo dicróico M40-DC400 (Rapp Opto Electronic, Hamburg). El LED se sincronizó con la cámara EMCCD con una caja de control para producir un flash de 2 ms por cada exposición. Se colectaron 120 imágenes/s en modo “full-chip” haciendo un promedio espacial de 4 píxeles (binning = 4X4) para las imágenes de campo grande. Las imágenes se registraron con el programa Andor iQ 1.8 (Andor Bioimaging, NC). El speract enjaulado se foto-activó con una lámpara de UV (UVICO; Rapp Opto Electronic) acoplada a un filtro de paso de banda (270–400 nm) conectado al sistema de iluminación mediante una fibra óptica (600 μm ó 4000 μm de diámetro, según el caso). Una unidad generadora de pulsos TTL (Andor Bioimaging, NC) conectada a un generador de pulsos Master 8 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) disparó la lámpara UV.

6.5 Rastreo de espermatozoides.

Se emplearon dos programas BohBoh v3.29 y spermware.

Spermware es un programa que estamos desarrollando en colaboración con el Dr. Jorge Carneiro (en el Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal) basado en un algoritmo de segmentación de imágenes que empleamos para rastrear los espermatozoides que no se entrecruzan. Básicamente el algoritmo busca los píxeles más brillantes que normalmente pertenece a la cabeza de los espermatozoides, empleando un umbral de discriminación de ruido definido por el usuario. Después el programa hace una búsqueda en imágenes consecutivas en regiones cercanas a donde se definió la posición de cada espermatozoide en la imagen anterior.

BohBohv3.29 es un programa desarrollado por nuestro colaborador S. Baba [34], con este se realizó un rastreo semi-automático de cada espermatozoide empleando el módulo de rastreo de células nadando ‘Tracking of Swimming Cells’; útil para los espermatozoides que se entrecruzan debido a que permite generar varias trayectorias incompletas y después unirlos.

Con las siguientes opciones activadas.

Options	Parameters
Elliptic Box	Frame-out Limit = 50
Fit Box angle, also	Chi-sq / dof Limit = 1500 - 2500
Initial grid search = 7 x 7	ER = 0.0000001 x1
Smoothing Filter W = 1	Fixed size tracking BOX by single mouse click Height = 5 Width = 3

Situé una caja elíptica de rastreo sobre los píxeles que correspondían al espermatozoides de interés (View/Draw ToolBar/Movie ToolBar/, ->Trace, Box, -> en el menú Tracking of Swimming Cells/Sel for tracking cells/start) e inicié el rastreo. Con lo anterior generé varias trayectorias incompletas que uní posteriormente. En algunos casos, donde había una densidad muy alta de espermatozoides, tuve que hacer un rastreo manual que después uní con las trayectorias rastreadas con las opciones anteriores.

Para el rastreo manual con la paleta de Movie ToolBar

->Trace chain -> Do input.

Para determinar cual tipo de análisis era el más adecuado realicé una discriminación visual considerando número de espermatozoides en el campo y el porcentaje de veces que se entrecruzaban.

La validación de las trayectorias rastreadas se hizo mediante estudios de correlación cruzada de las coordenadas (x, y) del espermatozoide en cuestión comparando las siguientes condiciones: rastreo manual vs rastreo bohboh, rastreo manual vs rastreo spermware, rastreo spermware vs rastreo bohboh. En todos los casos el valor de R² obtenido fue superior a 0.99, ver **Figura suplementaria 1**.

6.6 Procesamiento de Imágenes.

Las imágenes se procesaron con los programas ImageJ v1.37, Andor iQ 1.8 (Andor Bioimaging, NC); bohboh soft v3.29 y SpermWare. El análisis de datos se llevó a cabo con los programas SigmaPlot 9.0 y Microsoft Excel 2007.

Las imágenes empleadas para rastrear los espermatozoides no se filtraron, sin embargo se generó una copia de cada película que si fue procesada y que sirvió como una ayuda visual para los casos donde múltiples espermatozoides cruzaban. Implementé un filtro temporal que consistía en sumar las imágenes correspondientes a los primeros 3 minutos y restar la imagen resultante a cada una de las imágenes de la película (En andor iQ 1.8 Process \ Image-Image Math \ Subtract \ Time \ Self-Operation, taking average of selected rage for secondary). Lo anterior disminuyó el ruido de fondo y eliminó los espermatozoides inmóviles. Posteriormente promedié diez imágenes ($n_1+n_2...+n_{10}$) posteriores a cada marco y la coloqué en el marco n_1 (En andor iQ 1.8 Process \ Image Math \ Sum \ Time \ Running \ 10). Con lo anterior generé un archivo donde los espermatozoides parecían barras alargadas comparadas con la imagen antes de ser procesada, **Figura suplementaria 2**.

6.7 Determinación del centro del gradiente

Haciendo uso de la intensidad del flash de luz UV registrado durante cada experimento se hizo una búsqueda del pixel de mayor intensidad que normalmente correspondía al centro del campo. En ImageJ con la herramienta de caja rectangular de ImageJ seleccioné un recuadro que abarcaba toda la imagen, posteriormente grafiqué el perfil de los pixeles (Analyze/PlotProfile). Al emplear la selección rectangular se despliega una gráfica de los promedios de columnas, donde el eje 'x' representa la distancia horizontal a lo largo de la selección y el eje 'y' representa la intensidad promediada de los pixeles de la columna, ver **Figura suplementaria 3** (Realice el mismo procedimiento invirtiendo los ejes anteriores al apretar la tecla 'alt' durante el procesamiento, datos no mostrados). Finalmente exporté los datos a Excel y encontré el máximo valor de intensidad para 'x' e 'y'.

6.8 Implementación del índice de quimiotaxis LECI.

Una vez obtenidas las trayectorias de los espermatozoides calculamos la distancia al centro del gradiente para cada caso y la graficamos contra el tiempo. Ajustamos una línea recta a los datos anteriores para cada 1s, 3s ó 9s (según el análisis requerido) antes y después de la estimulación. El valor de LECI corresponde al valor negativo de la pendiente de esta línea recta.

6.9 Clasificación de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el speract.

Para cada espermatozoide de ambas especies, *L. pictus* y *S. purpuratus*, clasificamos los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la foto-activación del speract enjaulado en dos tipos: (+) y (-). Los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado hacia el centro del gradiente fueron catalogados como tipo (+); mientras que los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado en dirección contraria al centro del gradiente se clasificaron como tipo (-). Ya clasificados se obtuvo la frecuencia de incrementos tipo (-) y tipo (+) para cada espermatozoide. Aunado a esto, determinamos la posición de cada espermatozoide respecto al centro del gradiente en el instante que experimentó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) ó del tipo (-).

7 RESULTADOS.

Los espermatozoides de *S. purpuratus* son capaces de responder al speract alterando su patrón de nado mediado por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. La respuesta es un tren de fluctuaciones donde cada fluctuación corresponde a una vuelta y entre cada vuelta hay un periodo de nado recto [3]. La combinación de vueltas seguido de periodos de nado recto promueve un desplazamiento del espermatozoide con respecto a su posición original que tiene como consecuencia un incremento en la probabilidad de encontrar al óvulo. Aún cuando el espermatozoide de *S. purpuratus* logra su objetivo final, encontrar y fecundar al óvulo, parece ser que lo hace mediante un mecanismo diferente a la quimiotaxis. No hay reportes que indiquen que éstos experimentan un nado vectorial dirigido a la fuente. El speract induce cambios en el metabolismo de los espermatozoides de *L. pictus* muy similares a los que ocurren en los espermatozoides de *S. purpuratus* [15, 35-41]. Sin embargo, los cambios de movilidad que ocurren durante las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ no se han caracterizado. Aunado a esto, experimentos recientes indican que el speract induce una acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* en el campo analizado, **Figura 6** (Wood, datos no publicados), mediante un mecanismo que se asemeja a la quimiotaxis que aún está por ser caracterizado.

Para indagar en el mecanismo que regula el cambio en el patrón de nado inducido por el speract en los espermatozoides de *L. pictus* empleamos fibras ópticas líquidas con las cuales podemos generar gradientes de concentración del speract. Colocamos los espermatozoides de *L. pictus* en un medio que contenía una versión enjaulada del speract (CS) que posee una afinidad reducida por su receptor (≤ 1000 veces comparada con la molécula nativa). La exposición del CS al haz de luz ultravioleta elimina la inactivación del speract (la proporción de speract liberado comparado con la cantidad total de speract enjaulado depende de la intensidad y duración del estímulo UV). De esta manera, dentro de un gradiente de luz UV, la región de intensidad mayor va a liberar una concentración mayor de CS. La liberación del CS en presencia de los espermatozoides de *S. purpuratus* genera un patrón de vueltas superimpuestos con intervalos de nado recto de la misma manera que el speract nativo [3]. Encontramos un comportamiento muy similar con los espermatozoides de *L. pictus*. La **Figura 7** muestra un espermatozoide de *L.*

pictus experimentando un incremento transitorio en la fluorescencia del colorante Fluo-4 que refleja un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y su relación con el cambio en la curvatura de la trayectoria del nado. Se puede observar que el incremento en la fluorescencia del Fluo-4 ocurre concomitante con un incremento en la curvatura de la ruta (**Figura 7 A**), lo que ocasiona que el espermatozoide de una vuelta pronunciada (**Figura 7 B**). Posterior a la vuelta pronunciada hay una disminución de la curvatura de la ruta que corresponde a un periodo de nado recto, **Figura 7 A, B**. Seguido de ello hay un periodo de nado en una región ligeramente fuera de foco (datos no mostrados). Esta salida transitoria del plano focal imposibilita registrar la cinética de decaimiento en la fluorescencia del Fluo-4, **Figura 7 A** y datos no mostrados. Dado esto, en todos los resultados presentados definimos la posición del espermatozoide en el momento que experimenta un incremento en la fluorescencia del Fluo-4 como la primera imagen en que se ve el flagelo para cada incremento discreto (marcada con un asterisco), **Figura 7 A y B**.

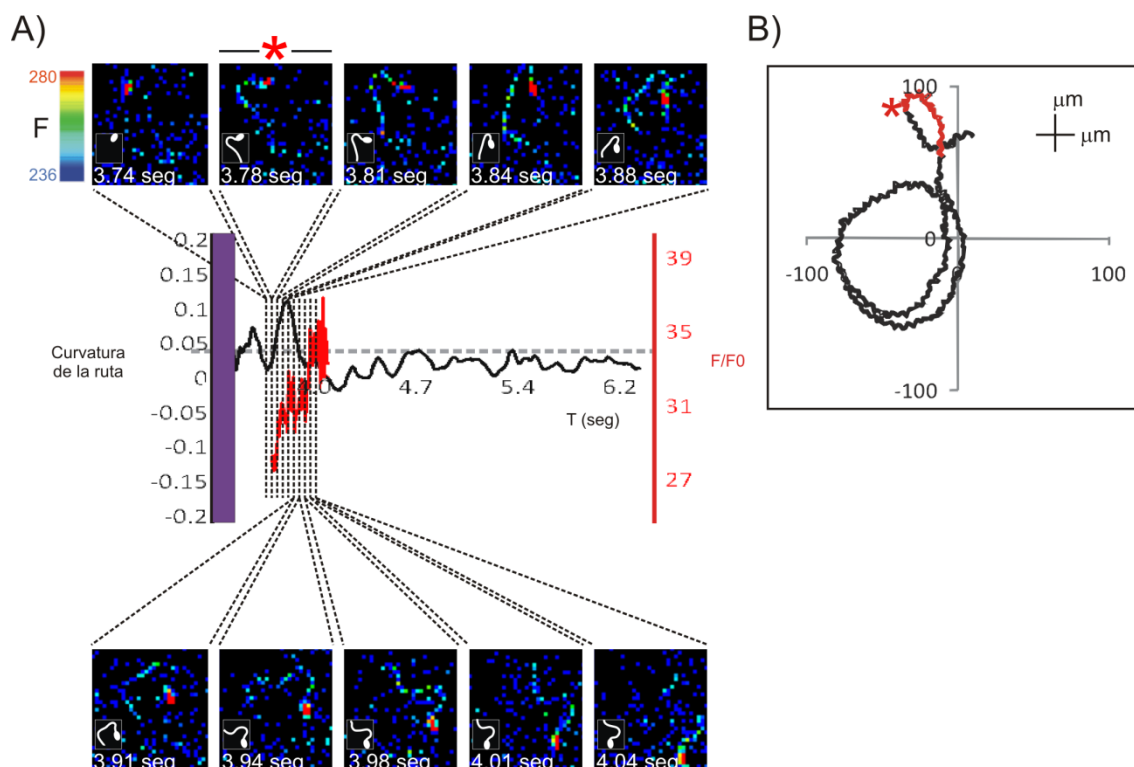
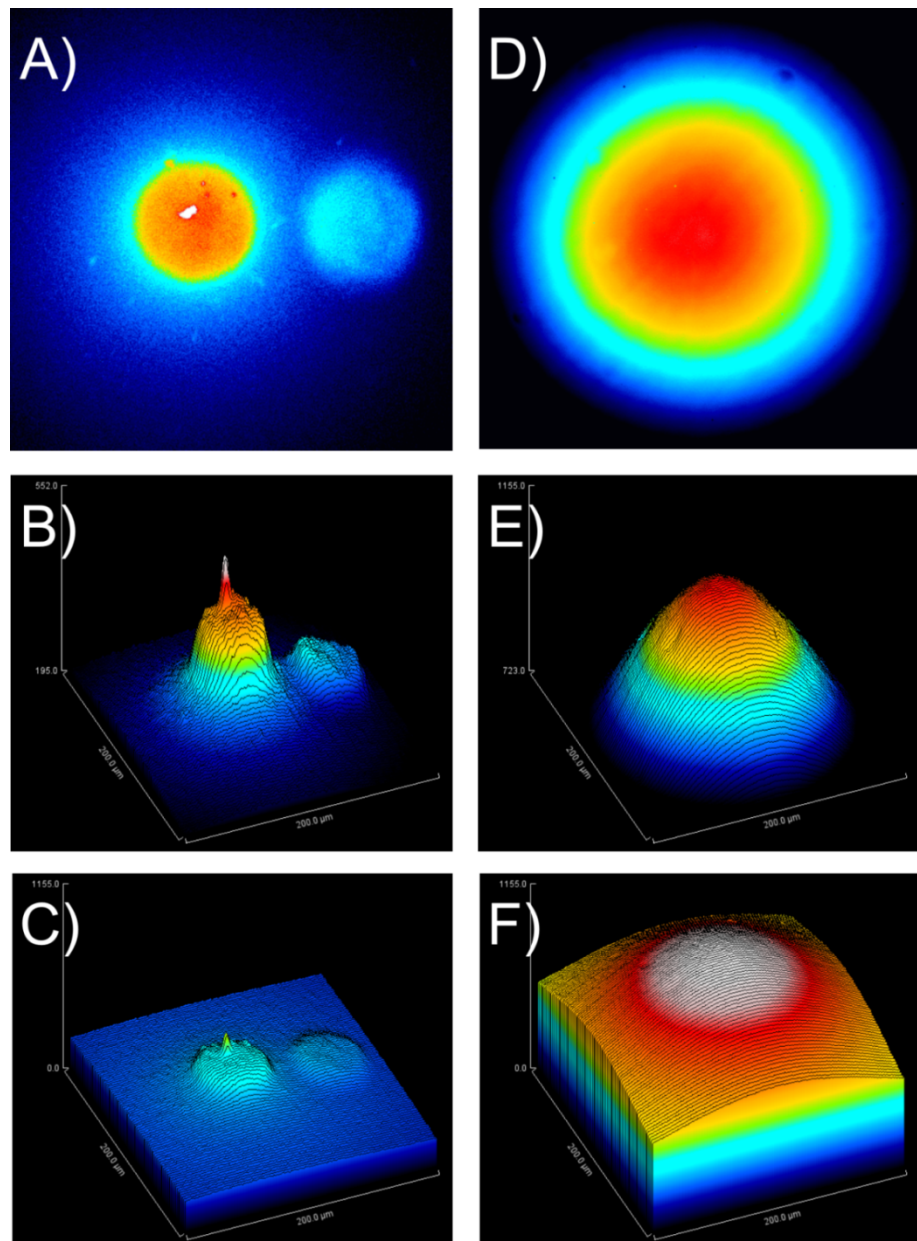


Figura 7. Espermatozoide de *L. pictus* experimentando un incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ que redirige su trayectoria de nado. A) Los paneles superiores e inferiores muestran las imágenes de un espermatozoide en movimiento experimentando un incremento transitorio en la fluorescencia de Fluo-4 en el flagelo inducido por la foto-activación del CS (200 ms UV). 1 pixel= 1.52 μm . Los insertos muestran la configuración del espermatozoide. El trazo negro corresponde a la curvatura de la ruta recorrida posterior al flash UV (caja morada). El trazo rojo ilustra el aumento en la fluorescencia del Fluo-4 integrado a lo largo del flagelo. **B)** Trayectoria recorrida por el espermatozoide de A) (trazo negro); el trazo rojo corresponde a la trayectoria

durante el incremento en la fluorescencia de Fluo-4 (el asterisco indica el inicio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$).

A diferencia de los espermatozoides de *S. purpuratus*, los cambios en el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus* promovieron un aumento en el número de espermatozoides dentro del campo (Wood, datos no publicados), **Figura 6**. Utilizando dos cables de luz líquidos ó fibras, una gruesa y una mediana (4000 μm y 600 μm de diámetro respectivamente) hicimos gradientes de concentración de diferentes intensidades. El paso de luz UV a través de la fibra mediana generó un gradiente muy concentrado en la región central y ligero en las regiones laterales **Figura 8A**. El paso de luz UV a través de la fibra gruesa generó un gradiente que abarcaba la mayor parte del campo, **Figura 8D**.

FIGURA 8
Gradientes de luz UV. Haz de luz UV generado con una lámpara de Xenón que viaja a través de un cable óptico con un diámetro de 600 μm **A)**, y 4000 μm en **D)**; la sombra azul situada a las 3 en punto en **A)** es un artefacto de iluminación intrínseco de los componentes ópticos empleados. **B, E)** Gráficas de superficie de **A)** y **D)** que ilustran la forma del gradiente; x, y representa la distribución espacial del campo analizado y z representa la intensidad del gradiente; las escalas son 195 - 552 píxeles (Fibra mediana) y 723 - 1155 píxeles (Fibra gruesa). **C, F)** Gráficas de superficies de **A)** y **D)** que ilustran la



intensidad del gradiente, en ambos casos se empleó una escala de 0-1155 pixeles.

Para ilustrar la forma del gradiente se realizaron gráficas de superficie donde a cada pixel se le asigna un valor de área. Se puede observar que el gradiente generado con la fibra gruesa abarcó la mayor parte del campo, **Figura 8E**, mientras que el generado con la fibra mediana se concentró en la región central, **Figura 8B**. En las **Figura 8 C y F**, se comparan las gráficas de superficie de los gradientes generados con las fibras mediana y gruesa (presentados en la **Figura 8 A y D**) empleando la misma escala de intensidad de color de los pixeles (0 - 1155). Se puede observar que la fibra mediana genera un gradiente de menor intensidad de luz UV si se compara con la fibra gruesa colocada en posición intermedia, **Figura 8 C y F**.

Hicimos varias combinaciones de fibras (600 y 4000 μm), concentraciones de CS (0.1, 1, 10, 100 nM), e intervalos de duración del flash de UV (50, 100, 200 ms) con la finalidad de evaluar el comportamiento de los espermatozoides de *L. pictus* bajo estas condiciones. Sin embargo, por razones de tiempo y simplificación, a lo largo de este escrito solo se presenta el análisis correspondiente a la fibra gruesa empleando una concentración de 10 nM de CS y un de flash de luz UV de 200 ms para desenjaularlo.

Tabla 1. Radio de trayectoria y velocidad de los espermatozoides de *L. pictus* sin ser estimulados

Erizo	Espermatozoide	Radio [†] (μm)	Velocidad [‡] ($\mu\text{m/s}$)
1	1	22.5 \pm 1.1	284.1 \pm 6.0
1	2	28.5 \pm 1.6	274.6 \pm 5.8
1	3	21.9 \pm 0.6	193.8 \pm 4.9
1	4	25.1 \pm 1.2	269.8 \pm 5.5
2	1	26.3 \pm 1.3	285.7 \pm 5.5
2	2	17.8 \pm 0.4	178.6 \pm 4.2
2	3	29.5 \pm 2.8	268.6 \pm 5.1
2	4	24.2 \pm 0.8	275.3 \pm 5.5
2	5	22.4 \pm 1.3	263.7 \pm 5.5
2	6	30.9 \pm 1.9	288.8 \pm 5.9
2	7	25.3 \pm 1.9	295.9 \pm 6.3
2	8	24.7 \pm 1.2	290.8 \pm 5.4
Promedio		24.9 \pm 1.0	264.1 \pm 10.9

En todos los casos los valores provienen al promedio de los valores durante 3s de rastreo.

(Radio \pm SE); (Velocidad \pm SE).

[†]No hay diferencia entre lotes (prueba t-student=0.8, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales).

[‡]No hay diferencia entre lotes (prueba t-student=0.6, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales).

7.1 El cambio en el patrón de nado de espermatozoides de *L. pictus* inducido por el speract depende de su posición con respecto al centro del gradiente.

En las **Figuras 9 y 11** se ilustran las trayectorias descritas por los espermatozoides de *L. pictus* antes y después de la foto-activación del CS. Antes de ser estimulados los espermatozoides nadan en trayectorias circulares con un radio relativamente constante, $24.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (trayectorias en negro, y **Tabla 1**), mientras que al ser estimulados experimentan vueltas pronunciadas intercaladas con periodos de nado recto (trayectorias en rojo, **Figuras 9 y 11**). Encontramos dos poblaciones de espermatozoides que experimentan un patrón de movimiento característico al ser estimulados: los que nadan a una distancia considerable al centro del gradiente durante la foto-activación del CS ($>40 \mu\text{m}$, **población lateral**), **Figura 9**; y los que están en una región cercana del centro gradiente durante la foto-activación del CS ($<40 \mu\text{m}$, **población central**), **Figura 11**.

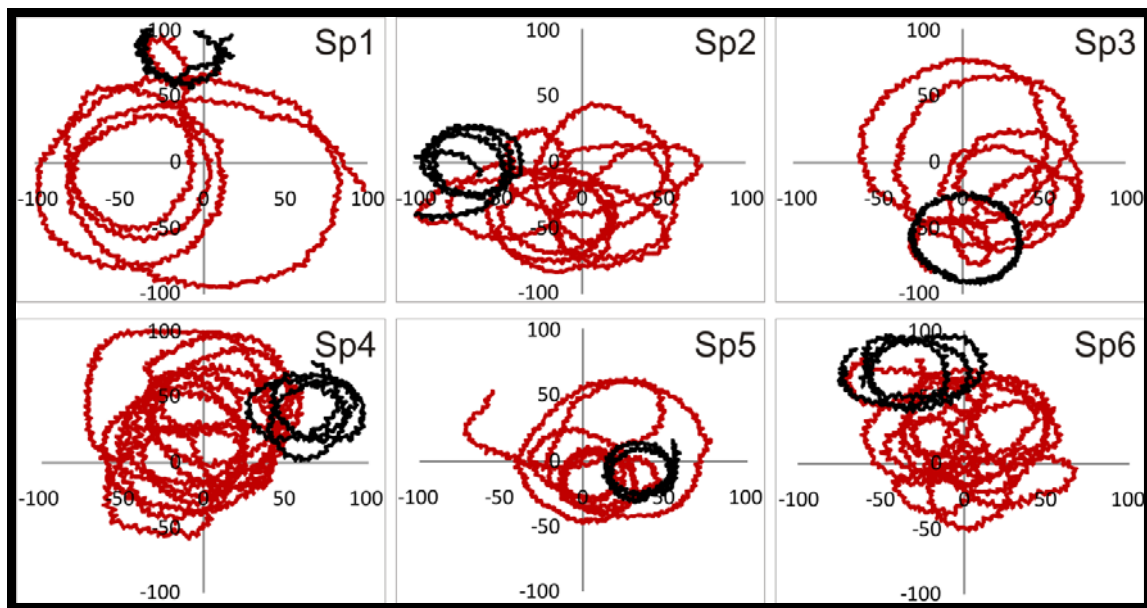


FIGURA 9. Trayectoria recorrida por los espermatozoides de *L. pictus* provenientes de la **población lateral** antes (negro) y después (rojo) de la foto-activación del CS. Coordenadas 'x-y' expresadas en μm ; 8 ms entre puntos sucesivos. Sp1, Sp2, Sp3,... Sp6, corresponden a seis espermatozoides diferentes.

En las **Figuras 10 y 12** se grafica la distancia de la posición de la cabeza del espermatozoide al centro del gradiente conforme transcurre el tiempo. La foto-activación del CS promueve un cambio en el patrón de nado de los

espermatozoides de *L. pictus* de la **población lateral** que consta de tres fases, **Figura 9 y 10**.

1. Búsqueda del centro del gradiente, **Figura 10 (barras de color rojo)**: Vuelta pronunciadas dirigidas al centro del gradiente asociadas a incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$, ver **Figura 7** y descripción en las páginas 25 y 26. Las vueltas pronunciadas están asociadas a periodos de alejamiento del centro del gradiente. Los periodos de nado recto son largos y terminan cuando el espermatozoide nada en dirección contraria al centro del gradiente para dar lugar a otra vuelta. En esta fase ocurre el acercamiento al centro del gradiente (los detalles de la respuesta quimiotáctica se describen en la sección posterior).

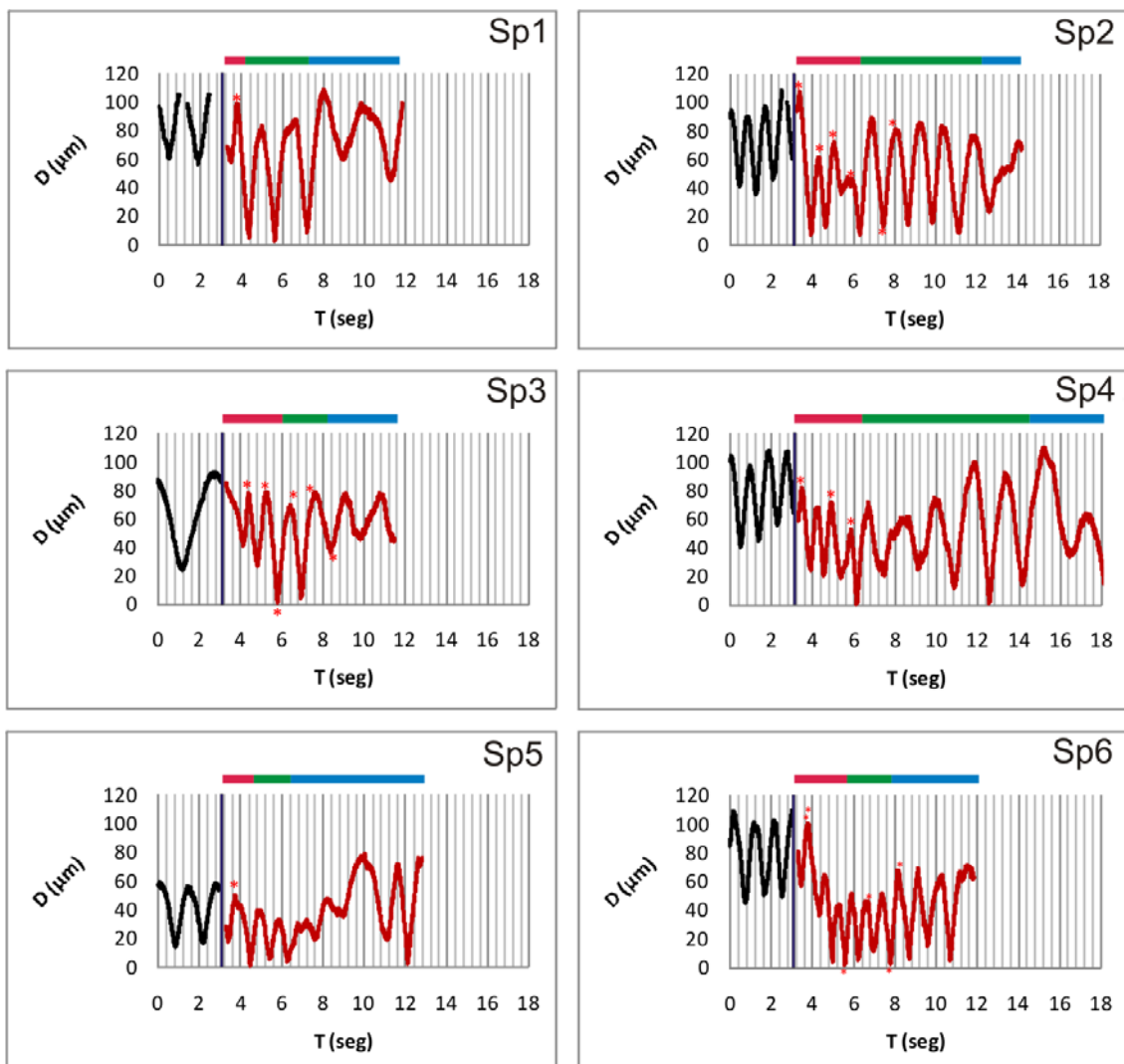


FIGURA 10. La foto-activación del CS promueve un cambio en el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus* de la **población lateral** que consta de tres fases. Distancia al centro del gradiente antes (negro) después (rojo) de la foto-activación del CS con un haz de luz UV (barra transversal de color morado, 200 ms). Las barras de color situadas en la parte

superior indican las fases del patrón de movimiento que experimentan los espermatozoides; 1ª - rojo, 2ª - verde y 3ª - azul. Los asteriscos indican la posición del espermatozoide en el momento de inicio de cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Sp1, Sp2, Sp3,... Sp6, corresponden a los espermatozoides 1 a 6 de la **Figura 9**

2. Búsqueda a distancia pasando por el centro del gradiente, **Figura 10 (barras de color verde)**. Caracterizado por una trayectoria de nado con un radio mayor (radio = $33.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$ (\pm SE); $n = 5$) a los círculos descritos previos a la exposición al speract (radio $24.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (\pm SE); $n = 12$). Éste tipo de nado posee la característica de que el espermatozoide atraviesa por el centro del gradiente, o una región muy cercana a éste, en cada vuelta.
3. Búsqueda a distancia sin pasar por el centro del gradiente **Figura 10 (barras de color azul)**. Nado en círculos muy grandes alrededor de la periferia del campo. No hay vueltas pronunciadas en ésta fase.

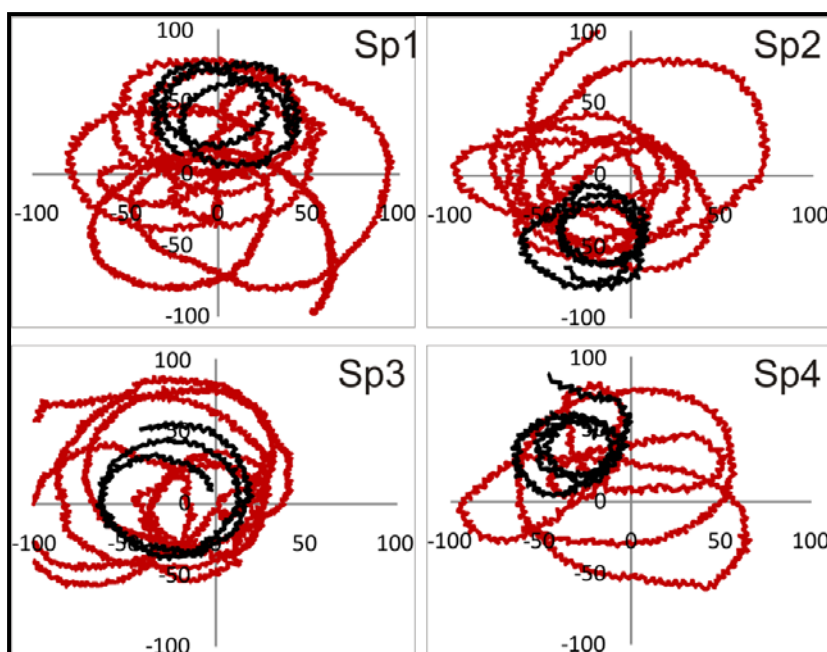


FIGURA 11. Trayectoria recorrida por los espermatozoides de *L. pictus* provenientes de la población central antes (negro) y después (rojo) de la foto-activación del CS. Coordenadas 'x-y' expresadas en μm ; 8 ms entre puntos sucesivos. Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4, corresponden a cuatro espermatozoides diferentes.

Los espermatozoides de la población central experimentan un cambio de patrón de nado inducido por la foto-activación del CS similar a los de la población lateral, **Figura 9 y 11**. Durante la fase de búsqueda del centro del gradiente los espermatozoides experimentan vueltas pronunciadas y periodos de nado recto posteriores a cada vuelta. Una diferencia clara es que en esta población la 1ª y 2ª fase están fusionadas: Los espermatozoides experimentan vueltas pronunciadas y atraviesan el centro del campo entre vuelta y vuelta **Figura 12 (barras de color**

amarillo). No hay una relocalización final de la posición de los espermatozoides; mientras que los espermatozoides de la **población lateral** se acercan al centro del campo durante la 1ª fase, los espermatozoides de la **población central** se mantienen en el centro del campo, ver **Figura 15**. La tercera fase parece ser de la misma naturaleza, ésta consta de círculos grandes en la periferia del campo sin atravesar el centro del gradiente, **Figura 12 (barras de color azul)**.

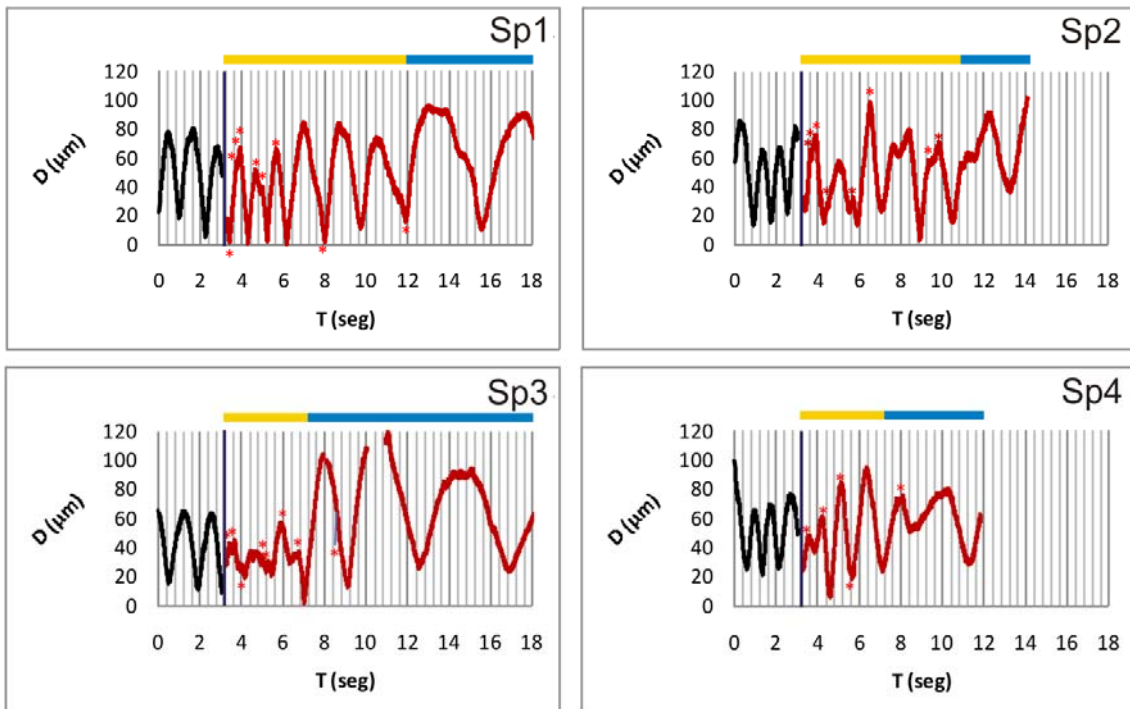


FIGURA 12 La foto-activación del CS promueve un cambio en el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus* de la **población central** que consta de dos fases. Distancia al centro del gradiente antes (negro) después (rojo) de la foto-activación del CS con un haz de luz UV (barra transversal de color morado, 200 ms). Las barras de color situadas en la parte superior indican las fases del cambio en el patrón de movimiento que experimentan los espermatozoides; 1ª-rojo, 2ª-azul. Los asteriscos indican la posición del espermatozoide en el momento de inicio de cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4 corresponden a los espermatozoides 1 a 4 de la **Figura 11**.

7.2 Papel del speract en la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.

La acumulación observada de los espermatozoides de *L. pictus* parecería deberse a quimiotaxis. Sin embargo el análisis mostrado en la **Figura 6** no permite discriminar entre quimiotaxis, atrapamiento y quimiocinesis. Para poder concluir que la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* se debe a un nado vectorial dirigido a una fuente es necesaria la implementación de un índice de quimiotaxis del tipo de LECI [33]. LECI es un parámetro que se deriva del valor negativo de la

pendiente m de una ecuación lineal de la forma $D = mT + b$, donde T es el tiempo y D es la distancia al centro del gradiente, **Figura 13A**. A partir de las gráficas D contra tiempo, mostradas en las **Figuras 10 y 12** se puede cuantificar la quimiotaxis experimentada en cada una de las fases descritas previamente.

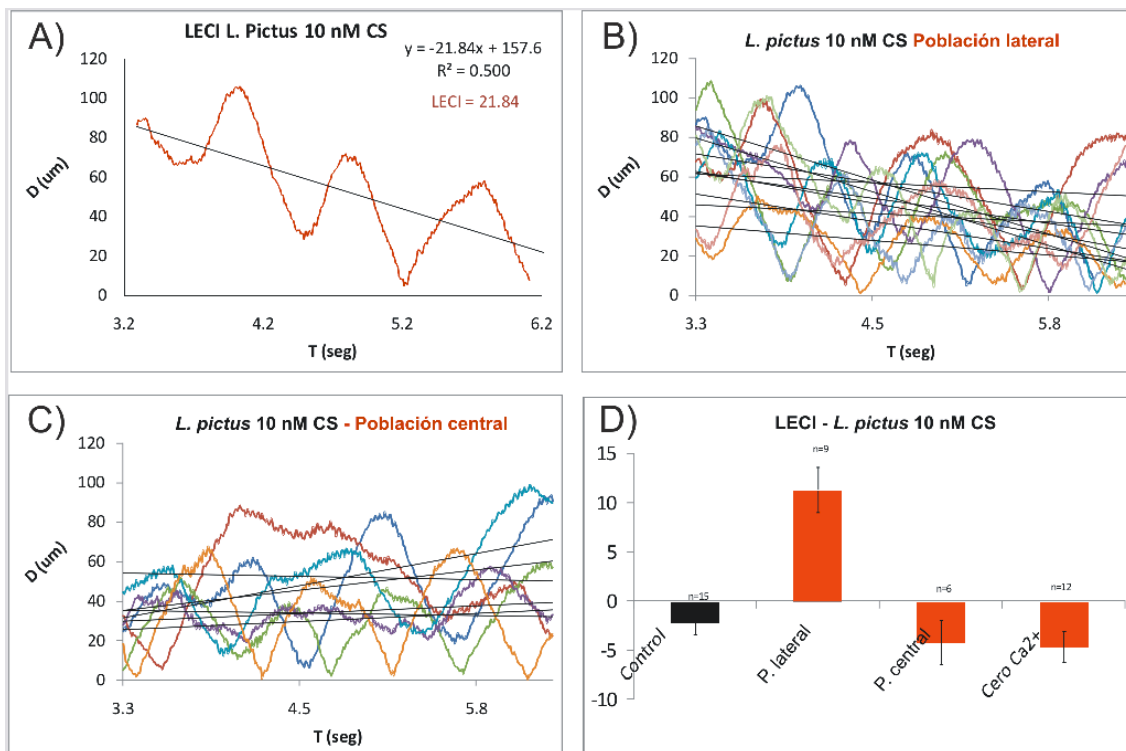


FIGURA 13 Los espermatozoides de *L. pictus* experimentan una respuesta quimiotáctica al ser expuestos a un gradiente de speract que depende de su posición previa a la estimulación. **A)** Índice de la ecuación lineal de la quimiotaxis (LECI) calculado para un espermatozoide de *L. pictus* 3 s posteriores a la foto-activación del CS. **B)** Rectas ajustadas a 9 espermatozoides individuales de la **población lateral**. **C)** Rectas ajustadas a 6 espermatozoides individuales de la **población central**. **D)** Valores de LECI calculados para 3 s antes (Control) y 3 s después (P. Lateral, P. central, Cero Ca^{2+}) de la foto-activación del CS (10 nM CS, 200 ms UV). Las barras corresponden al SE; n = número de células analizadas.

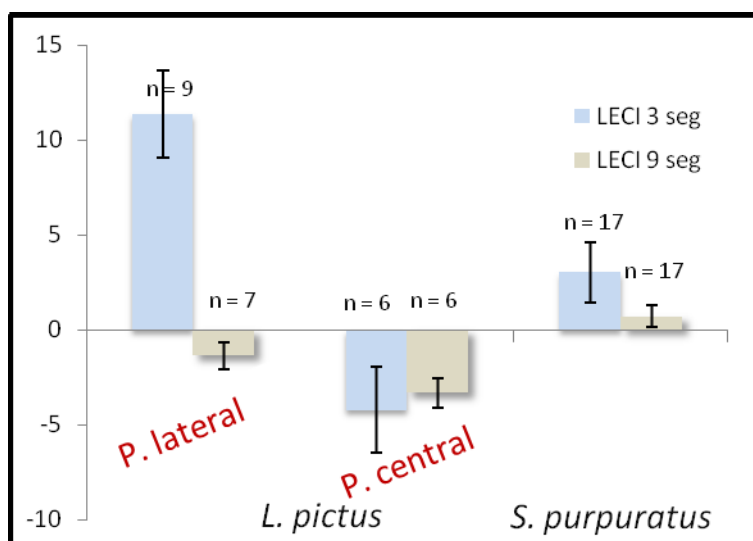
En la **Figura 13** se muestran los valores D contra tiempo de los espermatozoides de *L. pictus* de la **población lateral y central** durante los primeros 3 s posteriores a la estimulación (**Figura 13 B y C**). De igual manera se muestran las rectas que mejor se ajustan a los valores de D , **Figura 13 B y C**. Al obtener los valores de LECI para ambas poblaciones encontramos que solo la **población lateral** nos daba una diferencia significativa a un $\sigma = 0.001$ ($p = 1.0 \text{ E-}05$), con respecto al control (3 s antes de ser estimulados). (\dagger \ddagger Control = -2.18 ± 1.25 ; $\mu\text{m/s} \pm \text{SE}$; $n = 15$); (\dagger **P. lateral** = 11.36 ± 2.27 ; $\mu\text{m/s} \pm \text{SE}$; $n = 9$); (\ddagger **P. central** = -4.23 ± 2.27 \ddagger ; $n = 6$), **Figura 13 D**.

\dagger Diferencia significativa a un $\sigma=0.001$ (prueba t de Student = $1.0 \text{ E-}05$, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales).

\ddagger Diferencia **NO** significativa a un $\sigma=0.01$ (prueba t de Student = $4.1 \text{ E-}01$, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales).

El cambio en el patrón de nado inducido por la foto-activación del CS es un proceso dinámico debido a que los espermatozoides se están acercando y alejando continuamente **Figuras 9 - 12**. A su vez, la duración de las fases del cambio en el patrón de nado varía de espermatozoide a espermatozoide **Figuras 10 y 12**. Lo anterior sugiere que el valor de LECI también va a cambiar conforme se desarrolla la respuesta al speract. En la **Figura 14** se muestra el valor de LECI para los espermatozoides de las poblaciones **lateral** y **central** considerando una ventana de 9 s posteriores a la foto-activación de CS. Encontramos que el valor de LECI obtenido con una ventana de 9 s de los espermatozoides de la **población lateral** es 8.4 veces menor que el valor obtenido con una ventana de 3 s ($^{\text{E}}\text{P. lateral 3 s} = 11.36 \pm 2.27; \mu\text{m/s} \pm \text{SE}; n = 15$); ($^{\text{E}}\text{P. lateral 9 s} = -1.36 \pm 0.72; \mu\text{m/s} \pm \text{SE}; n = 15$), **Figura 14**. No hay diferencia a un $\sigma = 0.1$ entre el LECI obtenido de la **población central** con una ventana 3 y 9 s ($^{\text{†}}\text{P. central 3 s} = -4.23 \pm 2.27; \mu\text{m/s} \pm \text{SE}; n = 15$). ($^{\text{†}}\text{P. central 9 s} = -3.34 \pm 0.76; \mu\text{m/s} \pm \text{SE}; n = 15$), **Figura 14**.

Figura 14. La quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* inducida por la foto-activación del CS ocurre durante los primeros 3 s, bajo las condiciones experimentales evaluadas. Valores de LECI calculados para 3 s y 9 después de la foto-activación del CS (10 nM CS, 200 ms UV, fibra gruesa) de espermatozoides de ambas especies, *L. pictus* (población lateral y centro) y *S. purpuratus*. Las barras corresponden al SE; n = número de células analizadas.



Los datos anteriores indican que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, los espermatozoides de *L. pictus* de la **población lateral** experimentan una respuesta quimiotáctica durante los primeros 3 s tras la exposición a un gradiente de speract. El hecho de que el valor de LECI de los espermatozoides de la **población central** nos diera un valor que no era significativamente diferente del

$^{\text{E}}$ Diferencia significativa a un $\sigma=0.001$ (prueba t de Student = 3.8 E^{-04} , no-pareado, dos colas, varianzas diferentes).
 $^{\text{†}}$ Diferencia **NO** significativa a un $\sigma=0.1$ (prueba t de Student = 0.72, no-pareado, dos colas, varianzas diferentes).

en regiones muy cercanas a su posición inicial (atrapamiento), ver también **Figura 15 E y F**.

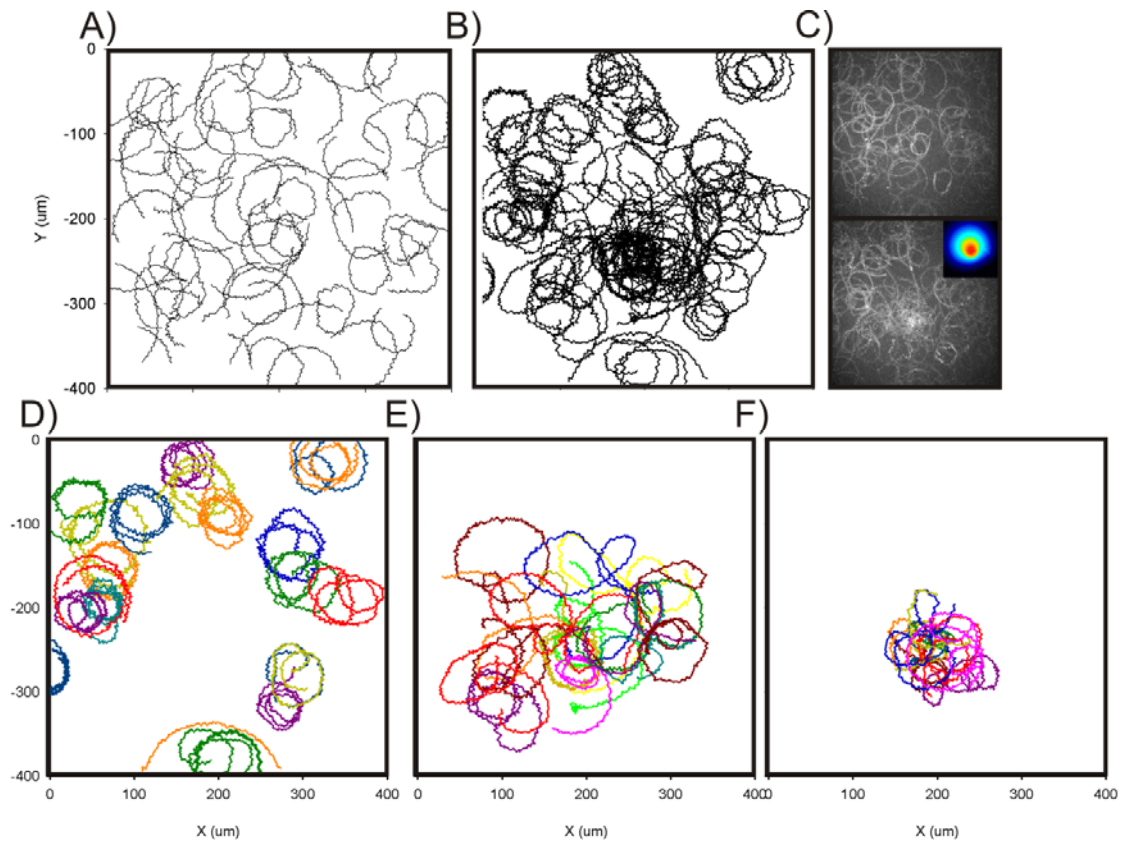


Figura 15. La posición de los espermatozoides con respecto al centro del gradiente durante la foto-activación del CS determina el tipo de respuesta. Trayectorias recorridas por los espermatozoides de *L. pictus* 1 s antes (A) y 3 s después (B, D, E y F) de la estimulación (10 nM CS, 200 ms flash UV, fibra mediana). C) Acumulación de los píxeles más brillantes de las imágenes correspondientes a 1 s antes de la foto-activación del CS (68 imágenes, panel superior) y 3 s después (204 imágenes, panel inferior); el inserto en el panel inferior muestra la forma del gradiente de luz UV. Trayectorias recorridas por todos los espermatozoides (A, B), los que no experimentaron cambios en el patrón de nado (D, población externa), los que se acercaron al centro del gradiente (E, población lateral), y los que se situaban en el centro y se mantuvieron ahí (F, población central). Espermatozoides teñidos con di-8-anepps visualizados a través de un objetivo 20x.

En todos los casos mostrados en las **Figuras 9 - 13** los espermatozoides experimentan un cambio en el patrón de nado, lo cual no descarta que la quimiotaxis observada en la población lateral sea debido a un fenómeno de quimiocinesis. El análisis presentado tiene la limitante de que no es posible rastrear a los espermatozoides que se salen del campo. En la **Figura 15** se presentan las trayectorias de los espermatozoides de *L. pictus* antes y después de foto-activar el CS (10 nM) empleando la fibra mediana y un haz de luz UV de 200 ms (objetivo 20x).

Tabla 2. La posición de los espermatozoides con respecto al centro del gradiente durante la foto-activación del CS determina la capacidad para experimentar una respuesta quimiotáctica. Valores de LECI calculados a partir de las trayectorias presentadas en la Figura suplementaria 4. **A)** Espermatozoides que no experimentaron cambios en el patrón de nado (población externa, n = 21). **B)** Espermatozoides que se acercaron al centro del gradiente (población lateral, n =14). **C)** Espermatozoides que se situaban en el centro y se mantuvieron ahí (población central, n = 10). Solo los espermatozoides de la población lateral experimentaron una respuesta quimiotáctica. Negro indica un valor de LECI positivo y rojo negativo. sp1, sp2,..., spX corresponden a los espermatozoides 1, 2, 3,..., X de cada población.

Población		Central	Lateral	Externa
Relocalización de la posición de los espermatozoides		Si	Si	No
Distancia al centro del gradiente		< 60 μm	60-170 μm	> 170 μm
		Valor de LECI ($\mu\text{m/s}$)		
Espermatozoide	sp1	25.2	39.4	15.8
	sp2	18.3	33.2	12.2
	sp3	14.9	27.0	12.1
	sp4	12.3	26.0	8.2
	sp5	0.3	25.9	7.3
	sp6	-3.4	23.7	7.2
	sp7	-4.9	22.8	6.5
	sp8	-6.2	20.3	3.8
	sp9	-6.7	16.7	2.8
	sp10	-11.8	13.8	1.9
	sp11		6.3	0.2
	sp12		1.6	-1.2
	sp13		-9.3	-1.2
	sp14		-10.2	-3.8
	sp15			-4.0
	sp16			-4.7
	sp17			-5.3
	sp18			-6.4
	sp19			-11.2
	sp20			-11.9
	sp21			-16.2
Promedio		3.8 \pm 4.0	16.9 \pm 4.0	0.6 \pm 1.8

Clasificamos a los espermatozoides en 3 poblaciones basadas en su posición con respecto al centro del gradiente antes de ser estimulados: **Población externa** (> 170 μm del centro del gradiente), **lateral** (60-170 μm del centro del gradiente), y **central** (< 60 μm del centro del gradiente), **Figura 15 D, E y F**, respectivamente. Los espermatozoides de la **P. externa** no experimentaron una relocalización de su posición posterior a la foto-activación del CS (**Figura 15 D**). Todos los

espermatozoides de la **P. lateral** se acercaron al centro del gradiente y dieron valores de LECI positivos (**Figura 15 E, Tabla 2**), lo que descarta la posibilidad de que la quimiotaxis observada en las **Figuras 10 y 13** se deba a un fenómeno de quimiocinesis. Los espermatozoides de la **P. central** experimentaron cambios en el patrón de nado, pero no experimentaron una relocalización de su posición al ser estimulados (**Figura 15 F, Tabla 2**). La evidencia anterior demuestra que los espermatozoides de *L. pictus* experimentan una respuesta quimiotáctica al ser expuestos a un gradiente de speract que depende de su posición inicial con respecto al centro. Así mismo la presencia de un gradiente de speract promueve que los espermatozoides de *L. pictus* experimenten otros fenómenos como el atrapamiento (**P. central**) que también dependen de su posición con respecto al centro del gradiente.

7.3 La ocurrencia de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides de *L. pictus* está correlacionada con la dirección del nado y su posición con respecto al centro del gradiente.

La tasa de asociación del speract a su receptor es muy alta ($K_{on} = 2.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y la de disociación es muy baja ($K_{off} = 4.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [42], lo que indica que la tasa de asociación del speract a su receptor es irreversible en la escala de tiempo de nuestro estudio. Así, el espermatozoide experimenta un aumento continuo en la cantidad de moléculas de speract que se unen a él, donde la dirección y velocidad de nado del espermatozoide determinan la cantidad de moléculas capturadas en una escala de tiempo dada. Cuando el espermatozoide nada hacia el centro de un gradiente de concentración de speract experimenta un incremento en la velocidad de unión del speract. De la misma manera cuando un espermatozoide nada en dirección contraria al centro del gradiente experimenta una disminución en la velocidad de unión del speract. Así, el movimiento de un espermatozoide desde y hacia la fuente del speract permite que éste perciba cambios en la tasa de asociación. Lo anterior sugiere que la dirección del nado del espermatozoide y su cercanía al centro del gradiente desempeñan un papel en la respuesta quimiotáctica.

Böhmer demostró que las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentadas por los espermatozoides de *A. punctulata*, al ser estimulados con el resact, correlacionan

con la dirección del nado con respecto al centro del gradiente; éstas inician después de que el espermatozoide experimentó un periodo de alejamiento del centro del gradiente [26]. En las **Figuras 7, 10 y 12** se ilustra con asteriscos la posición de los espermatozoides de *L. pictus* en el momento del inicio de cada incremento discreto en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentado después de la foto-activación del CS. Encontramos que estos están correlacionados con la dirección del nado de los espermatozoides (asociadas los puntos críticos del valor de D, ver **Figuras 10 y 12**). Clasificamos los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ en dos tipos. Los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado hacia el centro del gradiente fueron catalogados como tipo (+); mientras que los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado en dirección contraria al centro del gradiente se clasificaron como tipo (-).

Bajo las condiciones experimentales evaluadas la mayoría de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentados por los espermatozoides de *L. pictus* fueron del tipo (-): 78.5 %[†] en los espermatozoides de la **población lateral** (0.41 ± 0.07 ; #Incrementos / s \pm SE; n = 8 espermatozoides), y 79.5 %[‡] en los espermatozoides de la **población central** (0.53 ± 0.06 ; # Incrementos / s \pm SE; n = 4 espermatozoides); ver la **Figura 20, y Tabla 3**. Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de tipo (+) ocurrieron con menor frecuencia: 21.5 %[†] en los espermatozoides de la **población lateral** (0.11 ± 0.04 ; #Incrementos / s \pm SE; n = 8 espermatozoides) y 20.5 %[‡] en los espermatozoides de la **población central** (0.14 ± 0.04 ; #Incrementos / s \pm SE; n = 6 espermatozoides); ver la **Figura 20 y Tabla 3**. No encontramos diferencia entre el número total de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ al comparar las poblaciones **lateral** y **central** (prueba t-Student = 0.32, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales, $\sigma = 0.01$), ver **Tabla 3**.

Si un espermatozoide se encuentra en una región de alta concentración de speract, como los espermatozoides de la **población central**, los cambios en la tasa de asociación van a ser diferentes a los experimentados cuando el espermatozoide se encuentra en una región de baja concentración de speract, como los espermatozoides de la **población lateral**. Es posible que la posición del

^{†, ‡} Diferencia significativa a un $\sigma=0.05$ (prueba t-Student = $9.4 E-04^{\dagger}$; $1.5 E-03^{\ddagger}$; respectivamente), no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales).

espermatozoide con respecto al centro del gradiente inflencie el tipo de respuesta experimentada al exponerlo a un gradiente de speract. Determinamos la posición de cada espermatozoide respecto al centro del gradiente en el instante que experimentó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) ó del tipo (-).

En la **Figura 16** se grafica la posición de los espermatozoides de *L. pictus* respecto al centro del gradiente en el instante que experimentaron un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) ó del tipo (-). Bajo las condiciones experimentales evaluadas los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) (**Figura 16 A y B**, círculos) ocurrieron cuando los espermatozoides nadaban en regiones lejanas al centro del gradiente ($\geq 42 \mu\text{m}$, ver **Figura 22**); mientras que los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) (**Figura 16 A y B**, triángulos invertidos) ocurrieron cuando los espermatozoides nadaban en una región cercana al centro del gradiente ($\leq 42 \mu\text{m}$, ver **Figura 22**). El comportamiento anterior no depende de posición inicial del espermatozoide durante el momento de estimulación (comparar **población lateral y central** en la **Figura 16 A y B**).

Es posible que la primera, o las primeras fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ sean las desencadenen y/o determinen la respuesta quimiotáctica. En la **Figura 16** se ilustra, en color rojo, la posición de cada espermatozoide analizado en el instante que experimentó el primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de las **poblaciones lateral** (**Figura 16 A**, $n = 8$) y **central** (**Figura 16 B**, $n = 6$). En todos los casos el primer incremento experimentado por los espermatozoides de la **población lateral** fue del tipo (-) (8/8) y ocurrió cuando el espermatozoides se situaba a una distancia $> 42 \mu\text{m}$ del centro del gradiente, **Figura 16 A**. La mayoría de los espermatozoides de **población central** experimentaron un incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) (5/6), **Figura 16 B**. Los símbolos azules en **Figura 16** ilustran la posición de los espermatozoides en el momento que experimentaron los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ subsecuentes. Ambas poblaciones de espermatozoides, **P. lateral** y **P. central**, experimentaron los dos tipos de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes distancias con respecto al centro del gradiente, ver **Figura 16**. **P. lateral**: 27 del tipo (-) y 6 del tipo (+), $n = 8$ espermatozoides; **P. central**: 38 del tipo (-) y 14 del tipo (+), $n = 6$ espermatozoides.

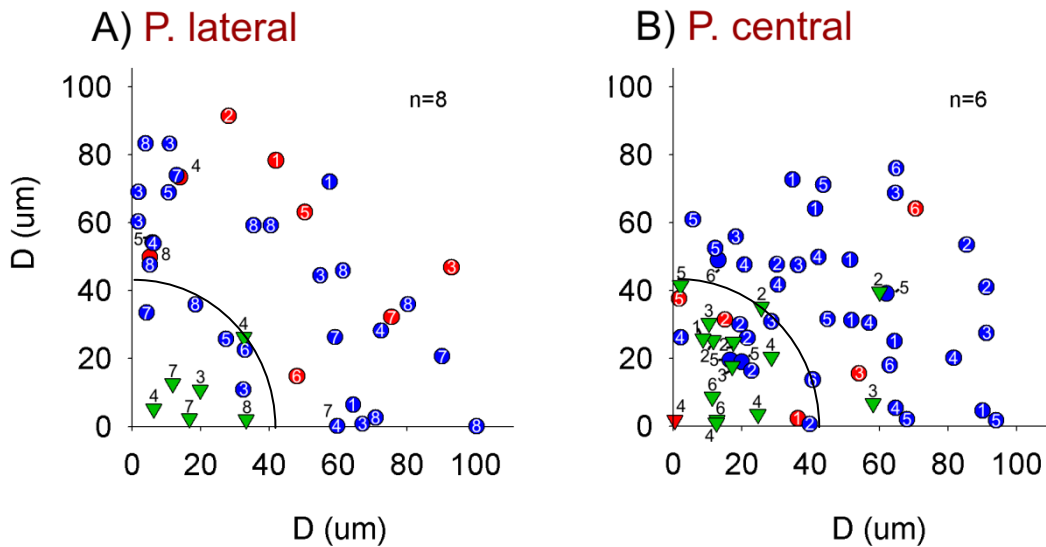


FIGURA 16 Posición de los espermatozoides de *L. pictus* respecto al centro del gradiente en el instante que experimentan un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) ó del tipo (-). (ver sección 6.9) A) Población lateral. B) Población central. Cada evento representa la posición de un espermatozoide en el instante que experimentó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) (círculos) o del tipo (+) (triángulos invertidos). Los símbolos de color rojo corresponden al primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Los símbolos de color azul y verde corresponden a los incrementos subsecuentes en la $[Ca^{2+}]_i$ tipo (-) y tipo (+), respectivamente. Los números 1, 2, 3,...n corresponden a los espermatozoides #1, 2, 3...n. En A) se presentan 43 eventos correspondientes a 8 espermatozoides, mientras que en B) se presentan 58 eventos correspondientes a 6 espermatozoides. La línea de color negro se asignó a mano en función de los datos de la **Figura 22**.

7.4 La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de *L. pictus* requiere Ca^{2+} extracelular.

Un componente indispensable para la quimiotaxis es la presencia de calcio extracelular [6, 14]. La ausencia de Ca^{2+} extracelular elimina las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por los SAPs, elimina las vueltas pronunciadas y la respuesta quimiotáctica [6, 14, 23]. Al estimular a los espermatozoides de *L. pictus* en agua de mar libre de Ca^{2+} , bajo las mismas condiciones experimentales indicadas en las **Figuras 9-16**, eliminamos la generación de vueltas pronunciadas (**Figura 17**) y la respuesta quimiotáctica, **Figura 13 E**. (\dagger LECI 1 s antes del flash UV = -1.67 ± 9.94 ; $\mu\text{m/s} \pm \text{SE}$; n = 14); (\dagger LECI 3 s después flash UV = -4.69 ± 1.58 ; $\mu\text{m/s} \pm \text{SE}$; n = 12). Tras la estimulación, el radio de los círculos que describen los espermatozoides, nadando en cero Ca^{2+} , incrementa de manera constante, **Figura 17**.

\dagger Diferencia **NO** significativa a un $\sigma=0.01$ (prueba t-Student = $7.7 \text{ E-}01$, no-pareado, dos colas, considerando varianzas distintas).

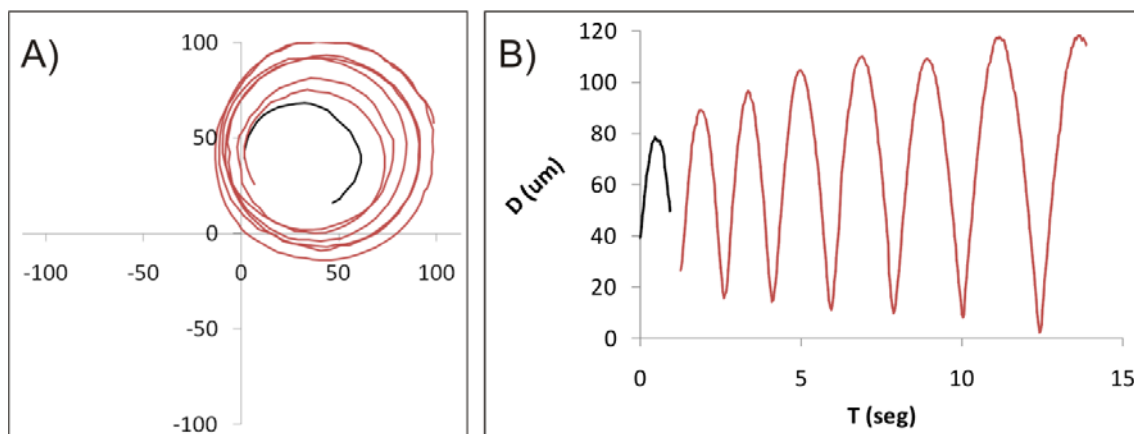


FIGURA 17. La ausencia de Ca^{2+} extracelular elimina las vueltas pronunciadas experimentadas por los espermatozoides de *L. pictus* al ser expuestos a un gradiente de speract. Se muestra la trayectoria recorrida por un espermatozoide antes (negro), y después (rojo) de la foto-activación del CS en ausencia de Ca^{2+} extracelular. A) Trayectoria recorrida por el espermatozoide. B) Distancia al centro del gradiente D contra tiempo de la trayectoria de A). 120 imágenes/ s. Se rastreó una de cada 4 imágenes.

7.5 Los espermatozoides de *S. purpuratus* experimentan cambios de movilidad similares a los espermatozoides de *L. pictus* durante la primera fase, pero carecen de la segunda y tercera fase.

Expusimos a los espermatozoides de *S. purpuratus* al mismo gradiente de speract que promovió la generación de una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides de *L. pictus* para determinar las similitudes y diferencias en cuanto al cambio en el patrón de nado y la capacidad para experimentar quimiotaxis. Encontramos que el cambio de movilidad en los espermatozoides de *S. purpuratus* es diferente a los de *L. pictus*, comparar **Figuras 9, 16 y 18**. Al ser estimulados, los espermatozoides de *S. purpuratus*, experimentan una relocalización de su posición mediada por un cambio en el patrón de nado (vueltas pronunciadas inducidas por incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y periodos de nado rectos). (**Figuras 4, 18, 19**). El cambio en el patrón de nado experimentado por los espermatozoides de *S. purpuratus* difiere al que experimentan los espermatozoides de *L. pictus* (ambos expuestos a las mismas condiciones experimentales) en el sentido de que los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentan la 2^a y 3^a fase descritas previamente en los espermatozoides de *L. pictus*, comparar **Figuras 9 - 10 y 18**.

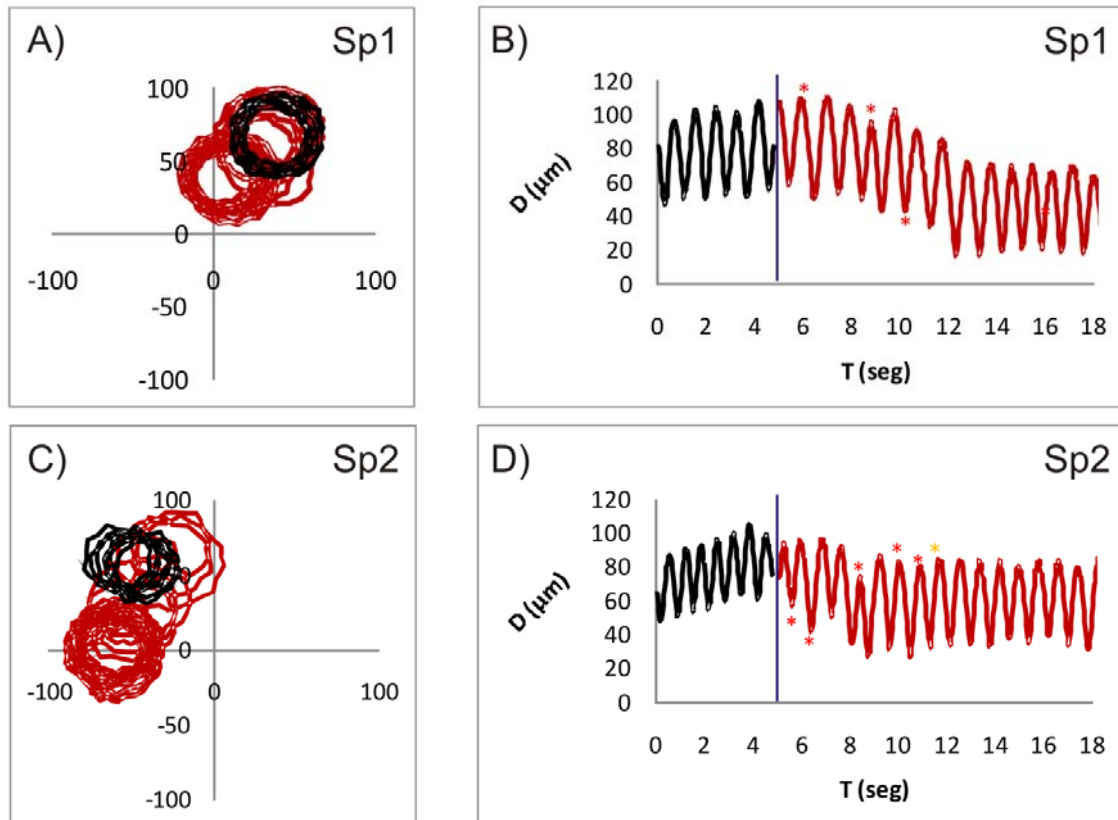
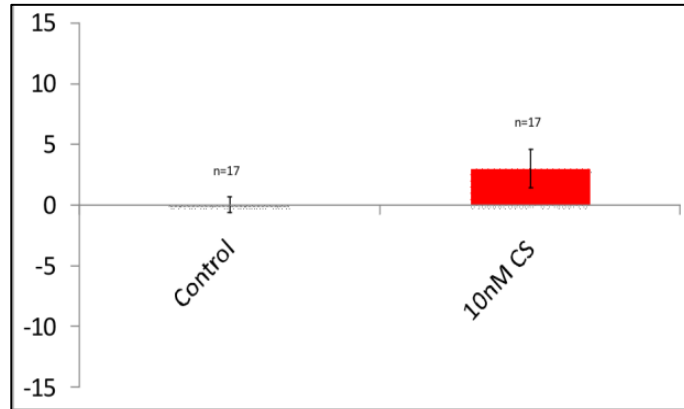


FIGURA 18. Espermatozoides de *S. purpuratus* experimentando un cambio en el patrón de nado tras la exposición a un gradiente de speract. **A, C)** Se muestra la trayectoria recorrida por 2 espermatozoides antes (negro), y después (rojo) de la foto-activación del CS. **B, D)** Distancia al centro del gradiente contra tiempo. Los asteriscos indican el momento de inicio de cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. 120 imágenes/ s. Se rastreó una de cada 4 imágenes.

7.6 Los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentan una respuesta quimiotáctica bajo las mismas condiciones donde los espermatozoides de *L. pictus* si lo hacen.

Empleamos el índice de LECI para cuantificar, en términos de quimiotaxis, la respuesta experimentada por los espermatozoides de *S. purpuratus* al ser expuestos al mismo gradiente donde observamos quimiotaxis con los espermatozoides de *L. pictus*. No observamos una diferencia significativa respecto al control (trayectorias correspondientes a los mismos espermatozoides 3 s previos a la estimulación). ($LECI_{Estimulados\ 3s} = 3.02 \pm 1.57; \mu m/s \pm SE; n = 17$); ($LECI_{Control\ 3s} = 0.06 \pm 0.67; \mu m/s \pm SE; n = 7$). (Prueba t-Student = 0.097, no-pareado, dos colas, considerando varianzas distintas, $\sigma=0.01$), **Figura 19**.

FIGURA 19. Los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentan una respuesta quimiotáctica al ser estimulados con un gradiente de speract. Índice LECI calculado a partir de 17 espermatozoides de *S. purpuratus* antes (control) y después de la foto-activación del CS (10 nM CS, Fibra gruesa, 200 ms UV).



Una posibilidad es que la quimiotaxis en los espermatozoides de *S. purpuratus* sea un proceso más lento y que requiera una ventana de tiempo mayor. Calculamos el valor de LECI para un periodo de 9 s posteriores a la estimulación ($LECI_{Estimulados\ 9s} = 0.71 \pm 0.59$) y tampoco observamos una diferencia significativa respecto al control, ver **Figura 14**. (Prueba t-Student = 0.47, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales, $\sigma=0.01$).

7.7 Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentados por los espermatozoides de *S. purpuratus* después de un periodo de nado hacia o desde el centro del gradiente ocurren con la misma frecuencia.

Es posible que el fenómeno de quimiotaxis experimentado por los espermatozoides de erizo de mar esté influenciado por la dirección del nado del espermatozoide con respecto al centro del gradiente. En la **Tabla 3** se presenta el número de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de tipo (-) o del tipo (+) contra tiempo, para ambas especies. En la sección 7.2 mostramos que los espermatozoides de *L. pictus* tienden a experimentar una proporción mayor de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) con respecto a los del tipo (+), ver **Figura 20**. A diferencia de los espermatozoides de *L. pictus*, los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) experimentados por los espermatozoides de *S. purpuratus* ocurren con la misma proporción que los del tipo (+). 53.7 % del tipo (-) (0.32 ± 0.06 ; #Incrementos / s \pm SE; n = 10 espermatozoides); 46.3 % del tipo (+) (0.27 ± 0.05 ; #Incrementos / s \pm SE; n = 10 espermatozoides). (Prueba t-student = 0.576, no-pareado, dos colas, considerando varianzas iguales, $\sigma=0.01$), ver **Figura 20**. No hay diferencia en el

número total de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentadas por los espermatozoides de ambas especies, *L. pictus* y *S. purpuratus*, bajo las mismas condiciones experimentales, ver condiciones ‘Todas’ en **Tabla 3**.

Tabla 3. Número incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ tipo (-) o tipo (+) contra tiempo experimentadas por los espermatozoides de ambas especies al ser expuestos al mismo gradiente de speract.

Condición	<i>S. purpuratus</i>			<i>L. pictus</i>						
	Campo completo ^b		Todas ^b	Todas ^c	Campo completo ^c		Población Lateral ^d		Población Central ^e	
Tipo de incremento en la $[Ca^{2+}]_i$	-	+			-	+	-	+	-	+
#Incrementos/s	0.32	0.27	0.59	0.53	0.42	0.11	0.41	0.11	0.53	0.14
SE	0.06	0.05	0.10	0.07	0.05	0.03	0.07	0.04	0.06	0.04
Prueba t- Student ^a	0.576		0.974		2.0E-05		9.4E-04		1.5E-03	

- Incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ que ocurrieron después de que el espermatozoide experimento un periodo de alejamiento del centro del gradiente.
 + Incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ que ocurrieron después de que el espermatozoide experimento un periodo de acercamiento al centro del gradiente.
^a No pareados, dos colas, en dos muestras con varianzas iguales.
^b Espermatozoides analizados = 9; ^c Espermatozoides analizados = 13; ^d Espermatozoides analizados = 8; ^e Espermatozoides analizados = 4.

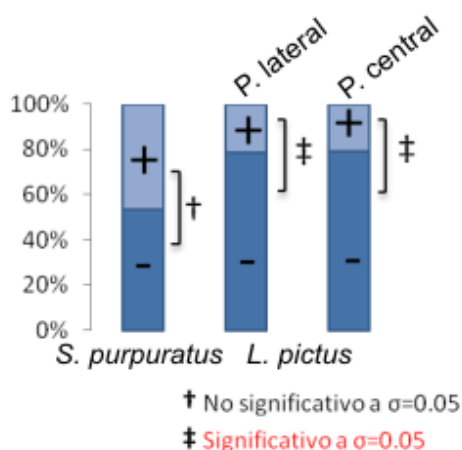


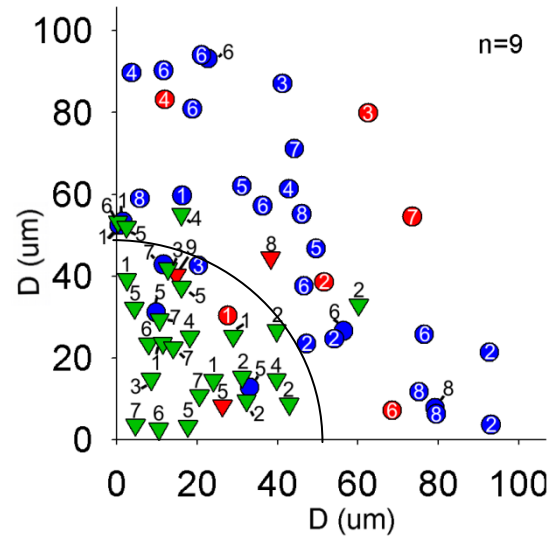
Figura 20. Porcentaje de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) y del tipo (+) experimentados por los espermatozoides de ambas especies, *S. purpuratus* y *L. pictus* tras la foto-activación del CS. Valores porcentuales obtenidos de los datos presentados en la **Tabla 3. Para los estudios de significancia se realizó la prueba t-Student; no pareada, dos colas, en muestras con varianzas iguales.**

7.8 La ocurrencia de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ está correlacionada con la dirección del nado de los espermatozoides de *S. purpuratus* y su posición con respecto al gradiente.

En la **Figura 21** se presenta la distribución de las posiciones de los espermatozoides de *S. purpuratus* al momento del inicio de cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la foto-activación del CS. En ambas especies de erizo de mar los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) experimentados por los espermatozoides ocurren cuando nadan en regiones cercanas al centro del gradiente ($< 42 \mu\text{m}$, *L.*

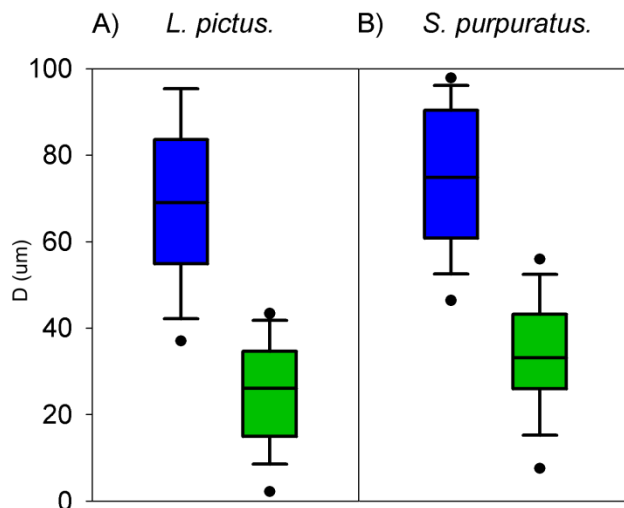
pictus; < 53 μm , *S. purpuratus*); mientras que incrementos $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) son favorecidos cuando los espermatozoides nadan en regiones lejanas al centro del gradiente (> 42 μm *L. pictus*; > 53 μm , *S. purpuratus*), ver **Figura 16 y 21**.

FIGURA 21. Posición de los espermatozoides de *S. purpuratus* respecto al centro del gradiente en el instante que experimentan un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (+) ó del tipo (-). Cada evento representa la posición de un espermatozoide en el instante que experimentó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) (círculos) o del tipo (+) (triángulos invertidos). Los símbolos de color rojo corresponden a la posición del espermatozoide cuando experimenta el primer incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los símbolos de color azul y verde corresponden a las posiciones de los espermatozoides durante los incrementos subsecuentes en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) y tipo (+), respectivamente. Los números 1, 2, 3,...n corresponden a los espermatozoides # 1, 2, 3...n. Se presentan 64 eventos correspondientes a 9 espermatozoides. La línea de color negro se asignó a mano en función de los datos de la **Figura 22**.



Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el 95 % de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) ocurrieron cuando los espermatozoides nadaban a una distancia considerable al centro del gradiente (42 - 95 μm , *L. pictus*; 53 - 96 μm , *S. purpuratus*), **Figura 22**. Así mismo, el 95 % de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (+) ocurrieron cuando los espermatozoides nadaban en regiones cercanas al centro del gradiente (8 - 42 μm , *L. pictus*; 15 - 53 μm , *S. purpuratus*), **Figura 22**. Los datos anteriores definen, bajo las condiciones experimentales evaluadas, un umbral de transición entre el desarrollo de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (+) y (-), situado a \sim 42 μm del centro del gradiente en el caso de *L. pictus*, y a \sim 53 μm del centro del gradiente en el caso de *S. purpuratus*, **Figura 22**.

Figura 22. Distribución de las posiciones de los espermatozoides de ambas especies, *L. pictus* y *S. purpuratus*, respecto al centro del gradiente en el instante que experimentan un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) (azul) ó del tipo (+) (verde). Las cajas contienen el 50 % de los eventos; la línea dentro de cada caja



corresponde a la mediana. Las barras delimitan un intervalo de confianza del 95 % y los círculos representan los valores fuera del rango del 95 %.

7.9 La presencia del ácido niflúmico altera el cambio en el patrón de nado inducido por el speract en ambas especies e inhibe la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus*.

Experimentos previos efectuados en nuestro laboratorio indican que la forma de la fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (amplitud, duración, etc.) regula las vueltas [3]. El ácido niflúmico (un inhibidor de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} [43]) altera las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ así como la duración de las vueltas inducidas en los espermatozoides de *S. purpuratus* [3, 23]. En la **Figura 23 A** se muestran las trayectorias de 3 espermatozoides de *S. purpuratus* antes y después de ser estimulados con el speract en la presencia de 10 μM de ácido niflúmico (**i**); también se muestran las gráficas de D contra tiempo (**ii**), (para una descripción detallada del efecto del ácido niflúmico en la respuesta al speract en los espermatozoides de *S. purpuratus* consultar [3]).

La foto-activación del CS en presencia de 30 μM de ácido niflúmico promovió un cambio en el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus* diferente al descrito en las secciones anteriores. La presencia del ácido niflúmico altera las vueltas inducidas por el speract en los espermatozoides de *L. pictus*, ver **Figura 23 B**. Bajo estas condiciones experimentales los espermatozoides de *L. pictus* no experimentaron la 2ª y 3ª fase característica del cambio en el patrón de nado, comparar **Figuras 9-12** y **Figura 23 B**. La presencia del ácido niflúmico eliminó la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* en el campo de registro inducida por la foto-activación del CS, **Figura 6**. Dado lo anterior decidimos evaluar el impacto que tiene la alteración de las vueltas en la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus*. En la **Figura 22** se ilustran los valores de LECI para ambas especies de espermatozoides, *S. purpuratus* y *L. pictus*, antes y después de la foto-activación del CS en la presencia de ácido niflúmico, **Figura 16**. En ambos casos no observamos una respuesta quimiotáctica: $\dagger LECI_{S. purpuratus}$ control 3s = -1.82 ± 2.73 (n = 16), $\dagger LECI_{S. purpuratus}$ Estimulados 3s = 0.81 ± 0.89 (n = 16); $\ddagger LECI_{L. pictus}$ control 3s = 0.60 ± 0.94 (n = 13), $\ddagger LECI_{L. pictus}$ Estimulados 3s = 4.45 ± 6.11 (n = 12).

\dagger, \ddagger Diferencia **NO** significativa a un $\sigma=0.01$ (prueba t-Student = ($\dagger 0.94, \ddagger 0.43$), no-pareado, dos colas, considerando varianzas diferentes).

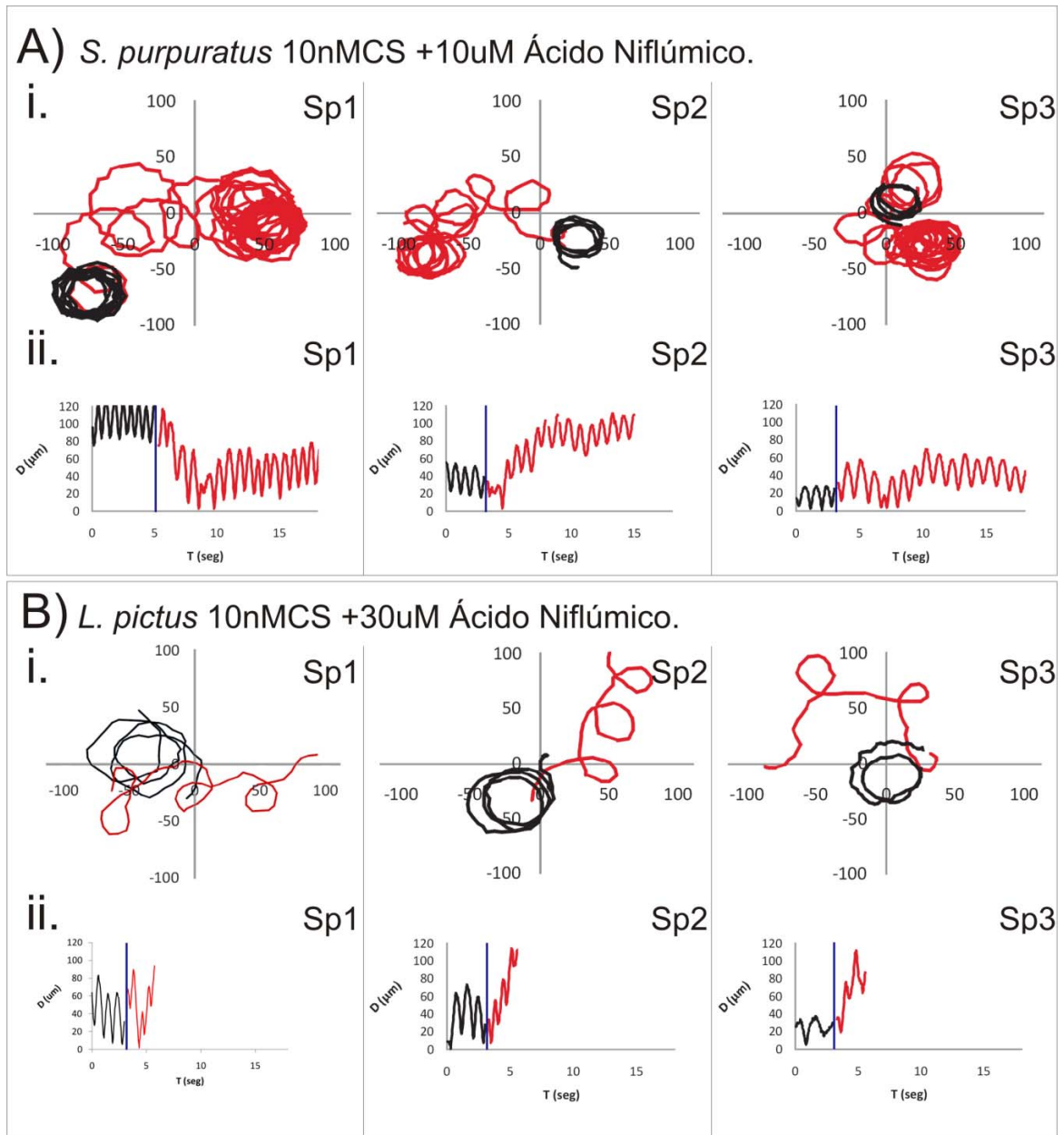


FIGURA 23. El Ácido Niflúmico altera las vueltas inducidas por la foto-activación del CS en los espermatozoides *S. purpuratus* y *L. pictus*. (i) Se muestra la trayectoria recorrida por 3 espermatozoides de *S. purpuratus* (A) y *L. pictus* (B), antes (negro), y después (rojo) de la foto-activación del CS (10 nM CS, Flash UV 200 ms) (línea morada) en presencia de 10-30uM de ácido niflúmico. (ii) Distancia al centro del gradiente contra tiempo. Sp1 - Sp3 corresponden a los tres espermatozoides de cada especie ejemplificados. 120 imágenes / s, se rastreó una de cada 4 imágenes.

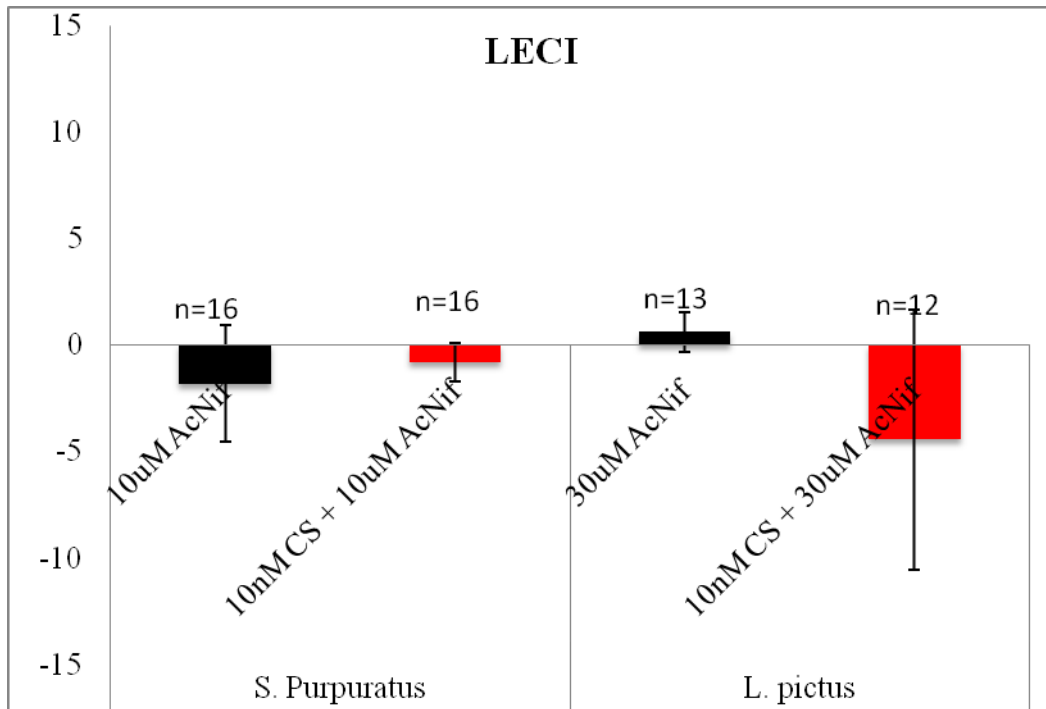


FIGURA 24 La presencia de ácido niflúmico elimina la respuesta quimiotáctica experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* al ser expuestos a un gradiente de speract. Índice LECI calculado para los espermatozoides de *S. purpuratus* y *L. pictus* antes (negro) y después (rojo) de la foto-activación del CS (10 nM CS, Flash UV 200 ms) en la presencia de ácido niflúmico (10 μ M para *S. purpuratus* y 30 μ M para *L. pictus*). Las barras representan el SE. No hay diferencias significativas entre condiciones control y estimulados (prueba t-Student = (0.94, 0.43; *L. pictus* y *S. purpuratus*, respectivamente), no-pareada, dos muestras con varianzas diferentes, $\sigma=0.01$)

8 DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se compara el comportamiento de los espermatozoides de dos especies de erizo de mar, *S. purpuratus* y *L. pictus*, que responden al mismo agonista, el speract. Ambos experimentan cambios en el patrón de nado promovidos por aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$. Demostramos que la presencia de un gradiente de speract promueve la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* debido a una respuesta quimiotáctica. Bajo las mismas condiciones los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentaron quimiotaxis. La presencia del ácido niflúmico altera el cambio en el patrón de nado inducido por el speract en ambas especies e inhibe la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus*, que a su vez depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular.

8.1 El papel del speract en la regulación de la movilidad del espermatozoide del erizo de mar, y sus implicaciones en la respuesta quimiotáctica.

Como mencionamos antes, el speract induce un tren de fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ que alteran el patrón de nado de los espermatozoides de *S. purpuratus* [3, 23]. Este cambio en la movilidad está caracterizado por vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto (**Figura 4**). El speract induce cambios en el metabolismo en los espermatozoides de *L. pictus* muy similares a los que ocurren en los espermatozoides de *S. purpuratus* [15, 35-41]. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el speract también induce fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides de *L. pictus* (Granados, datos no publicados). Sin embargo, la participación de las fluctuaciones en la motilidad de los espermatozoides de *L. pictus* no había sido caracterizada. Aunado a esto, datos recientes indican que al exponer a los espermatozoides de *L. pictus* a un gradiente de concentración de speract se acumulan en el centro del campo (**Figura 6**, Wood, datos no publicados). Nosotros encontramos que los espermatozoides de *L. pictus* experimentan incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ que redirigen su trayectoria de nado (**Figura 7, 9-12**). El comportamiento de estos en la presencia de un gradiente de concentración es muy diferente al de los espermatozoides de *S. purpuratus*, bajo condiciones experimentales idénticas (**Figuras 9-12 y 18**). Encontramos, por vez primera, que

los espermatozoides de *L. pictus* experimentan una respuesta quimiotáctica al ser expuestos a un gradiente de speract (**Figura 13**). Cabe enfatizar que, después de *A. punctulata*, ésta es la segunda especie de erizo de mar descrita que tiene espermatozoides que experimentan una respuesta quimiotáctica; la cual depende, en gran medida, de su posición con respecto al centro del gradiente durante el momento de la estimulación. Los espermatozoides de *L. pictus* que se encuentran a una distancia superior a $\sim 40 \mu\text{m}$ del centro del gradiente al momento de ser estimulados experimentaron un comportamiento conformado por tres etapas (bajo las condiciones experimentales evaluadas) (**Figuras 9 y 10**). La primera se caracteriza por vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto similares a las que experimentan los espermatozoides de *S. purpuratus* (**Figuras 9 y 10**). Bajo nuestras condiciones experimentales, esta 1ª fase dura ~ 3 s y es justo donde el índice de LECI dio un valor positivo, lo cual indica que es la fase donde ocurre la respuesta quimiotáctica (**Figuras 10 y 13**).

La liberación de los gametos (tanto óvulos como espermatozoides) al mar ocurre mediante un mecanismo concertado [44]. Hay evidencias de que el proceso quimiotáctico experimentado por los espermatozoides de varias especies marinas ocurre a distancias inferiores a 1 mm del óvulo. Esta escala es consistente con el límite de acción del quimioatrayente secretado por los óvulos de *Ciona* [45, 46]. Nosotros observamos que, bajo nuestras condiciones experimentales, la quimiotaxis ocurrió dentro de un radio de $200 \mu\text{m}$ al centro del gradiente (**Figuras 9, 10, 15 y Tabla 2**). Si consideramos que los espermatozoides que están experimentando vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto a una velocidad de $\sim 100\text{-}200 \mu\text{m/s}$, es muy factible que estos atraviesen el centro del gradiente durante los primeros 5-10 s tras ser estimulados. Lo anterior va de acuerdo con la ventana de tiempo (3 s) donde observamos quimiotaxis en los espermatozoides de *L. pictus*.

Bajo las condiciones experimentales evaluadas, la 2ª y 3ª fase del cambio de patrón de nado experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* está conformada por periodos de nado circular prolongados en los cuales las vueltas pronunciadas casi no ocurren (**Figuras 9 y 10**). Estos círculos poseen un radio mayor al que describen normalmente los espermatozoides que no han sido expuestos al speract. La 2ª y 3ª no están presentes en los espermatozoides de *S.*

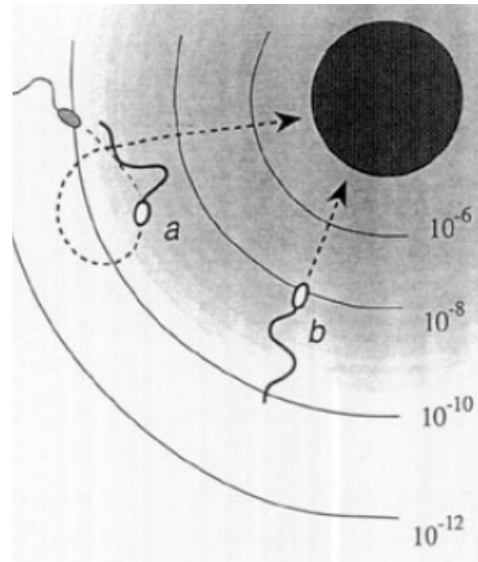
purpuratus (**Figura 18**). Es posible que exista un mecanismo de adaptación que, una vez encontrado el centro de gradiente, inhiba la generación de las vueltas pronunciadas. Otra alternativa, a la presencia de estos círculos grandes, podría ser una coordinación a larga escala entre varios espermatozoides. La interacción entre varios espermatozoides de la misma especie, es un fenómeno conocido que posiblemente proporciona ventajas competitivas, en particular en especies de fecundación interna que tienden a la promiscuidad [47]. Existe un reporte que indica que en superficies planas los espermatozoides de *S. purpuratus* se autoorganizan en vórtices giratorios que se asemejan a ondas rotatorias individuales [48]. Es posible que el desarrollo de la respuesta quimiotáctica involucre mecanismos hidrodinámicos donde la interacción entre diversos espermatozoides experimentando procesos similares tenga lugar.

8.2 El speract desencadena un sistema de generación de vueltas pronunciadas que es regulado por la información posicional que establece el gradiente del quimioatrayente.

En 1970 Miller demostró que los espermatozoides del cnidario *Tubularia campanularia* se acumulan debido a que dan vuelta y comienzan a nadar hacia la fuente [49]. La mayoría de las vueltas inician en el momento que el espermatozoide se aleja de la fuente, de tal manera que el estímulo que desencadena la vuelta es una disminución en la concentración del quimioatrayente. Dado esto, Miller propuso que estas vueltas ‘hacia fuera’ amplifican el estímulo, de tal suerte que las vueltas se vuelven más pronunciadas. Lo anterior continúa hasta que el espermatozoide comienza a experimentar un incremento en la concentración del quimioatrayente [49]. Nosotros encontramos en los espermatozoides de *L. pictus* la mayoría de las vueltas ocasionadas por incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ están asociadas a un periodo de alejamiento del centro del gradiente (**Figura 20**). En 1994 Cook y Babcock propusieron que la dirección del nado del espermatozoide con respecto al gradiente es la que determina el inicio de una vuelta pronunciada; el modelo establece lo siguiente [1]:

† Vuelta ‘hacia afuera’ proviene del inglés ‘outward’ turn, y corresponde a una vuelta que inició tras experimentar un periodo de alejamiento de la fuente del quimioatrayente.

...Para un espermatozoide que nada hacia la fuente de un quimioatrayente (como es el caso en b), los canales de K^+ se mantienen abiertos (debido al incremento en los niveles de GMPc) y suprimen la actividad de los canales de Ca^{2+} . Estos canales de K^+ , disminuyen la $[Ca^{2+}]_i$ al activar a los intercambiadores NCKX. Si el espermatozoide diverge de esta vía y deja de percibir una tasa de incremento suficientemente alta en la concentración del quimioatrayente (como el espermatozoide en a), la actividad de los canales de K^+ disminuirá, el potencial de membrana se repolarizará, y la $[Ca^{2+}]_i$ se elevará. El incremento resultante en la asimetría del flagelo culminará en una vuelta que posiblemente conduzca al espermatozoide a una vía más óptima (modificado de [1]).



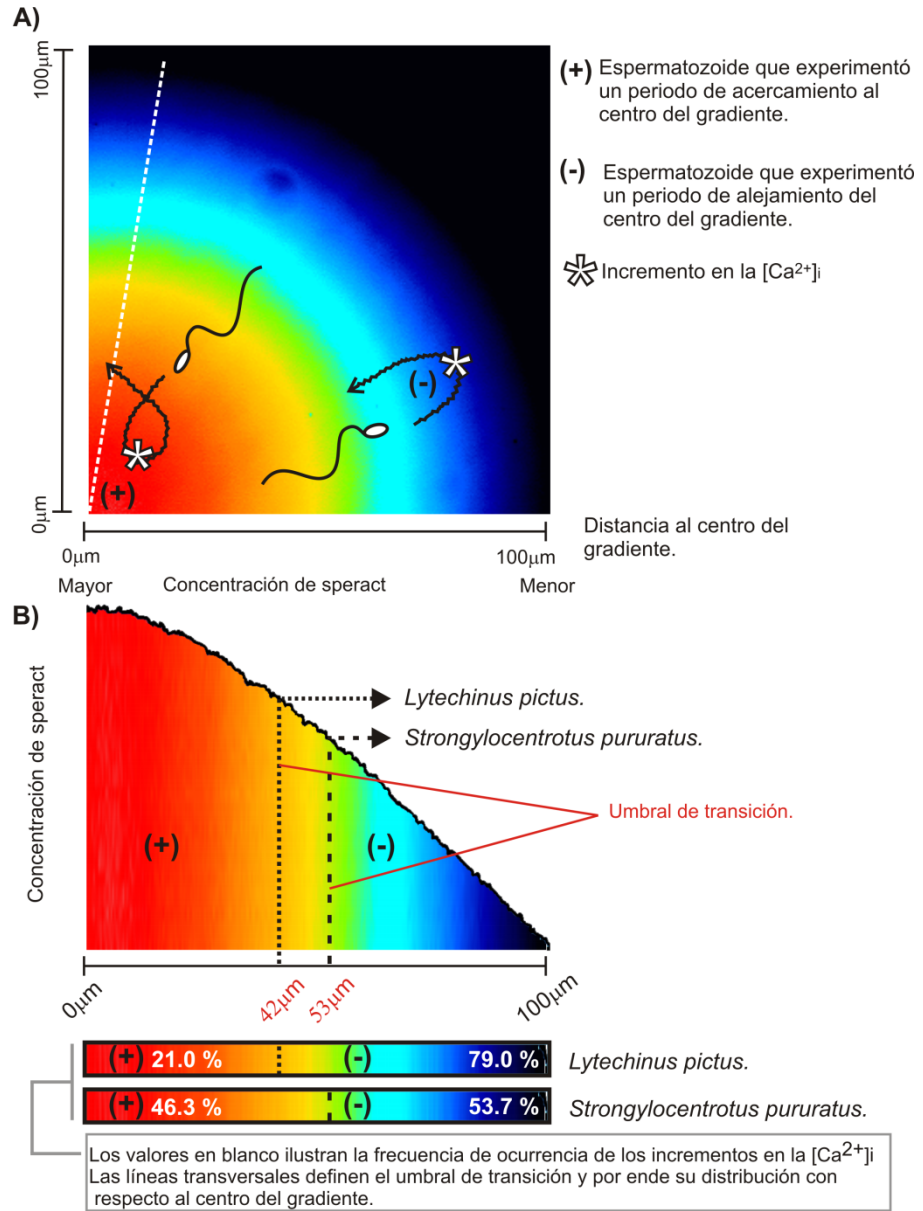
Por otro lado, nosotros encontramos un conjunto de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ asociados a vueltas pronunciadas que ocurrieron después de que los espermatozoides experimentaron un periodo de acercamiento al centro del gradiente, en ambas especies de erizo de mar, *L. pictus* y *S. purpuratus* (ver incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ tipo (+) en las **Figuras 10, 12, 16 y 20 - 22**). Miller demostró que este tipo de vueltas también son experimentadas por los espermatozoides de *Tubularia* [49]. Los resultados anteriores van en contra del modelo propuesto por Cook y Babcock [1] mencionado previamente ya no incorpora a los incrementos tipo (+) y sus vueltas asociadas. Entonces ¿Qué es lo que desencadena las vueltas a favor de gradiente? Miller propuso que la sensibilidad a la disminución en la concentración podría estar restringida a una región local del flagelo donde la oscilación del quimiorreceptor durante cada batido podría proporcionar la señal que dispara la vuelta [49]. En 1994, Cardullo demostró que el receptor del speract se encuentra a lo largo de todo el flagelo, más no en la cabeza, lo cual va en contra de la propuesta de Miller [50]. La fotoactivación de GMPc dentro de los espermatozoides de *A. punctulata* dispara un tren de fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ lo que indica que la generación de estas no requiere la presencia de un gradiente de concentración de quimioatrayente [23]. Nosotros encontramos que los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (+) ocurren cuando los espermatozoides nadan en una región cercana al centro del gradiente ($< 42 \mu\text{m}$ *L. pictus*; $< 53 \mu\text{m}$, *S. purpuratus*); mientras que incrementos $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) son favorecidos cuando los espermatozoides nadan en regiones lejanas al centro del gradiente ($> 42 \mu\text{m}$ *L. pictus*; $> 53 \mu\text{m}$, *S. purpuratus*), ver **Figuras 16, 21**

y 22. Es posible que en regiones donde la concentración de speract es muy alta el sistema de regulación que controla el inicio de cada incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ sea superado.

Figura 25. La exposición de los espermatozoides de erizo de mar a un gradiente de concentración de speract establece un umbral de transición entre los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ que ocurrieron después de experimentar un periodo de nado a hacia (+) o desde (-) el centro del gradiente.

A) Clasificación de los incrementos en $[Ca^{2+}]_i$. El gradiente de luz UV mostrado es el mismo que se ilustra en la **Figura 8D. B)** Diagrama que muestra la intensidad de los pixeles obtenidos de la línea blanca en A) y su

relación en μm con el centro del gradiente. Las líneas transversales muestran el umbral que define, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la transición de los incrementos del tipo (+) al tipo (-). En números blancos se presenta la frecuencia de ocurrencia de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ tipo (+) y tipo (-).



Los datos que presentamos a lo largo de en este trabajo muestran que, en ambas especies de erizo de mar, existe un umbral que determina la transición entre los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) y del tipo (+), **Figuras 22 y 25**. A su vez, nuestros datos indican que, bajo las condiciones experimentales evaluadas,

este umbral de transición se sitúa a diferentes distancias del centro del gradiente dependiendo de la especie ($\sim 42 \mu\text{m}$, *L. pictus*; $\sim 53 \mu\text{m}$, *S. purpuratus*) **Figuras 22 y 25 B**. La propuesta de la existencia de un umbral de concentración de speract sobre el cual el sistema de marcapasos no puede ser regulado concuerda en cierto modo con nuestros datos; sin embargo la ausencia de incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) en regiones muy cercanas al centro del gradiente no está de acuerdo **Figura 22 y 25 B**. Por el momento desconocemos como opera el mecanismo que regula el inicio de cada incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, así como el significado fisiológico de la existencia de este umbral de transición entre incrementos en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del tipo (-) y del tipo (+).

Los resultados anteriores se tienen que analizar tomando en cuenta que hay un periodo de demora entre la estimulación del receptor de los SAP y el inicio de cada incremento discreto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $\sim 190 - 600 \text{ ms}$ [21, 51, 52]. Este tiempo de demora es intrínseco de los componentes de la vía de señalización que tienen que ser activados antes de que ocurra la respuesta motora que cambia la dirección de nado del espermatozoide. Si consideramos que un espermatozoide de *L. pictus* nada a una velocidad de $\sim 260 \mu\text{m/s}$ y la circunferencia de la trayectoria circular es $\sim 157 \mu\text{m}^\dagger$; entonces el espermatozoide describe 1.6 vueltas/s (**Tabla 1**). De esta manera el espermatozoide recorre $\sim 0.32 - 0.96$ vuelta en un periodo de $\sim 200 - 600 \text{ ms}$. Lo anterior implica que en un espermatozoide que está experimentando una función de estimulación positiva, hay un tiempo de demora entre ésta y el inicio del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que puede ocurrir en el momento que la función de estimulación ya cambio de signo. Cabe destacar que el tiempo de retraso y el inicio del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependen de la concentración de SAP empleado; es decir a mayor concentración de SAP menor es el tiempo de retraso entre el inicio del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [52]. Dado esto el estudio de la relación entre la forma

[†]Obtenido a partir de $c = 2\pi r$ considerando un círculo con un radio de $25 \mu\text{m}$, ver **Tabla 1**.

del gradiente, la dirección del nado del espermatozoide al momento de ser estimulado, y el tiempo de demora en el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tendrá una importancia fundamental en el esclarecimiento del papel que tienen los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la quimiotaxis del erizo de mar. Aunado a esto es importante medir el cambio en la dirección del nado del espermatozoide

ocasionado por cada vuelta para determinar qué tipo de vueltas determinan la respuesta quimiotáctica.

8.3 El papel del Ca^{2+} en la respuesta quimiotáctica.

Cuando estimulamos a los espermatozoides de *L. pictus* en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular las vueltas pronunciadas y la respuesta quimiotáctica fueron eliminadas. Sin embargo no toda la respuesta al speract fue eliminada, dado que los espermatozoides comenzaron a describir círculos cada vez más grandes. Este incremento en el radio de la trayectoria puede ser debido a un aumento en la velocidad progresiva del espermatozoide que es independiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular [14]. Este incremento en la velocidad puede estar relacionado a un incremento en el pH intracelular que estimula la actividad ATPasa de las dineínas presentes en el axonema [2].

La presencia del ácido niflúmico altera las vueltas experimentadas por los espermatozoides de ambas especies y por ende la respuesta al speract. Si una vuelta es muy larga, o muy corta el espermatozoide terminará en una ubicación errónea con respecto al gradiente. Lo anterior fue evidente en el caso de los espermatozoides de *L. pictus* ya que la presencia del ácido niflúmico eliminó la acumulación, así como la respuesta quimiotáctica inducida por el speract. De estudios previos sabemos que el ácido niflúmico altera la cinética de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por el speract en los espermatozoides de *S. purpuratus* (posiblemente al bloquear canales de Cl^- activados por Ca^{2+}) [3]. Aunque sabemos que la concentración de Ca^{2+} en el ambiente cercano al axonema está relacionada al grado de desplazamiento de los microtúbulos, aún desconocemos la regulación dinámica de este proceso. Altas concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhiben la formación de la curva R e incrementan la asimetría del flagelo al permitir una disminución de la actividad de las dineínas en el doblete # 3 [11]. Hay evidencia que sugiere que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el speract está correlacionado con el aumento en la curvatura de la ruta descrita por el espermatozoide [3], (ver **Figura 4 C**). Sin embargo, la cinética de la regresión de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hacia su nivel basal no está correlacionada con la disminución en la curvatura de la ruta (ver **Figura 4 C**) sugiriendo que los periodos de nado recto operan bajo mecanismos independientes a los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dado esto, es posible que los

mecanismos que regulan la respuesta quimiotáctica, y que determinan las diferencias entre especies, se encuentran al nivel relación entre la cinética de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ y el sistema de navegación del espermatozoide.

8.4 El espermatozoide posee un sistema de navegación que requiere la coordinación entre periodos de viraje (vueltas pronunciadas) y periodos de nado recto que se asemeja al de las bacterias.

Independientemente del mecanismo empleado, tanto las bacterias como los espermatozoides pueden detectar los estímulos quimioatrayentes correspondientes, responder a ellos alterando su patón de movimiento, y finalmente localizar la fuente [3, 53]. En ambos casos hay un periodo mediante se redirige el destino de las células; ejemplo, la rotación en el sentido de las manecillas del reloj del(los) flagelo(s) de las bacterias que hace que viren [3, 53], y las vueltas pronunciadas promovidas por los incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ que experimentan los espermatozoides al ser expuestos a las moléculas quimioatrayentes. En ambos casos los periodos de viraje están intercalados con periodos de nado recto [3, 53]. Es posible que la coordinación fina entre periodos de viraje y periodos de nado recto sea lo que determina la capacidad para encontrar la fuente.

9 CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se compara el comportamiento de los espermatozoides de dos especies, *S. purpuratus* y *L. pictus*, que responden al mismo agonista, el speract. Ambos experimentan cambios en el patrón de nado, promovidos por aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$. Mediante el uso del índice de quimiotaxis LECI demostramos que la presencia de un gradiente de speract promueve la acumulación de los espermatozoides de *L. pictus* debido a una respuesta quimiotáctica. Bajo las mismas condiciones, los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentaron quimiotaxis.

Caracterizamos el cambio en el patrón de nado inducido por la exposición al gradiente de speract en los espermatozoides de ambas especies. La respuesta experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* depende de su posición con respecto al centro del gradiente durante el momento de estimulación. Cuando se encuentran a una distancia considerable del centro del gradiente ($>40 \mu\text{m}$, **población lateral**) experimentan tres fases:

1. Búsqueda del centro del gradiente: Caracterizada por vueltas pronunciadas (asociadas a incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$) seguidas de periodos de nado recto largos.
2. Búsqueda a distancia, pasando por el centro del gradiente. Caracterizada por círculos grandes que atraviesan el centro del gradiente.
3. Búsqueda a distancia, si pasar por el centro del gradiente. Caracterizada por círculos de mayor radio que los de la 2ª fase que no atraviesan el centro del gradiente.

Durante la 2ª y 3ª fase los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ casi no ocurren.

Cuando los espermatozoides de *L. pictus* nadaban en una región cercana del centro gradiente durante la foto-activación del CS ($<40 \mu\text{m}$, **población central**) la 1ª y 2ª fase están fusionadas; es decir, las vueltas pronunciadas ocurren durante la 2ª fase. Los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentaron la 2ª y 3ª fase del cambio en el patrón de nado característico de los espermatozoides de *L. pictus*.

Encontramos que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la respuesta quimiotáctica experimentada por espermatozoides de *L. pictus* ocurre durante los primeros 3 s tras la foto-activación del speract enjaulado que corresponden a la 1ª fase de la **población lateral**. Los espermatozoides de la

población central experimentaron atrapamiento debido a que los espermatozoides se mantuvieron nadando en regiones cercanas al centro del gradiente. Los datos anteriores indican que la quimiotaxis es un proceso dinámico que ocurre en una ventana de tiempo corta, donde la posición del espermatozoide con respecto al centro del gradiente determina el mecanismo de reorientación que el espermatozoide emplea para ubicar la fuente y llegar a ella. Aunado a esto, demostramos que la quimiotaxis experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* requiere la presencia de Ca^{2+} extracelular.

Clasificamos los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la foto-activación del speract enjaulado en dos tipos. Los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado hacia el centro del gradiente fueron catalogados como tipo (+); mientras que los que ocurrieron después de que el espermatozoide experimentó un periodo de nado en dirección contraria al centro del gradiente se clasificaron como tipo (-).

Una diferencia notable entre los espermatozoides de *L. pictus* y *S. purpuratus* es que la mayoría de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentados por los espermatozoides de *L. pictus* fueron del tipo (-) (78.5 % en la **población lateral**, 79.5% en la **población central**). Por el contrario los espermatozoides de *S. purpuratus* experimentaron la misma proporción de incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ del tipo (-) y del tipo (+) (53.7 y 46.3 %, respectivamente). Lo anterior puede ser la causa de la ausencia de una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides de *S. purpuratus* bajo las condiciones experimentales evaluadas.

La presencia del ácido niflúmico altera el cambio en el patrón de nado inducido por el speract en ambas especies e inhibe la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus*.

10 PERSPECTIVAS.

Aún cuando los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentaron una respuesta quimiotáctica bajo las condiciones experimentales evaluadas aun no descartamos la posibilidad de que éstos puedan experimentar quimiotaxis bajo condiciones experimentales distintas. Dicho esto pretendemos evaluar diferentes formas de gradientes de speract empleando fibras ópticas de diferente grosor, haciendo combinaciones de concentraciones de speract enjaulado y duraciones de flash UV.

La inhibición de la respuesta quimiotáctica debido a la presencia del ácido niflúmico sugiere que la relación entre los cambios del Ca^{2+} y la curvatura del flagelo es fundamental en la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar. Dado lo anterior, es necesario estudiar la relación fina entre el Ca^{2+} y la asimetría del flagelo antes y durante la vuelta en ambas especies de espermatozoides, con la finalidad de dilucidar los componentes importantes para la quimiotaxis.

La fecundación es un fenómeno que ocurre en una escala tridimensional, el análisis presentado se restringe a lo que ocurre en un espacio en dos dimensiones definido por la restricción natural que experimentan los espermatozoides del erizo de mar al interactuar con la superficie agua-vidrio. Recientemente desarrollamos un equipo que nos permite rastrear a los espermatozoides en 3D [53]. Al acoplar el sistema de foto-activación al sistema de adquisición de imágenes en 3D pretendemos caracterizar la quimiotaxis en un contexto tridimensional.

Es posible que ambas especies posean un sistema de reorientación seleccionado de manera precisa para responder a entornos naturales diferentes. Hay indicios que muestran la importancia que tienen los fluidos turbulentos en la tasa de fecundación de organismos de reproducción externa [54]. El uso de dispositivos que permiten estudiar el impacto de los cambios en la turbulencia de manera controlada como las cámaras Taylor-Couette permitirá dilucidar los mecanismos que emplean los espermatozoides de diferentes especies para detectar la presencia del óvulo, llegar a él y fecundarlo bajo contextos naturales específicos.

11 MATERIAL SUPLEMENTARIO

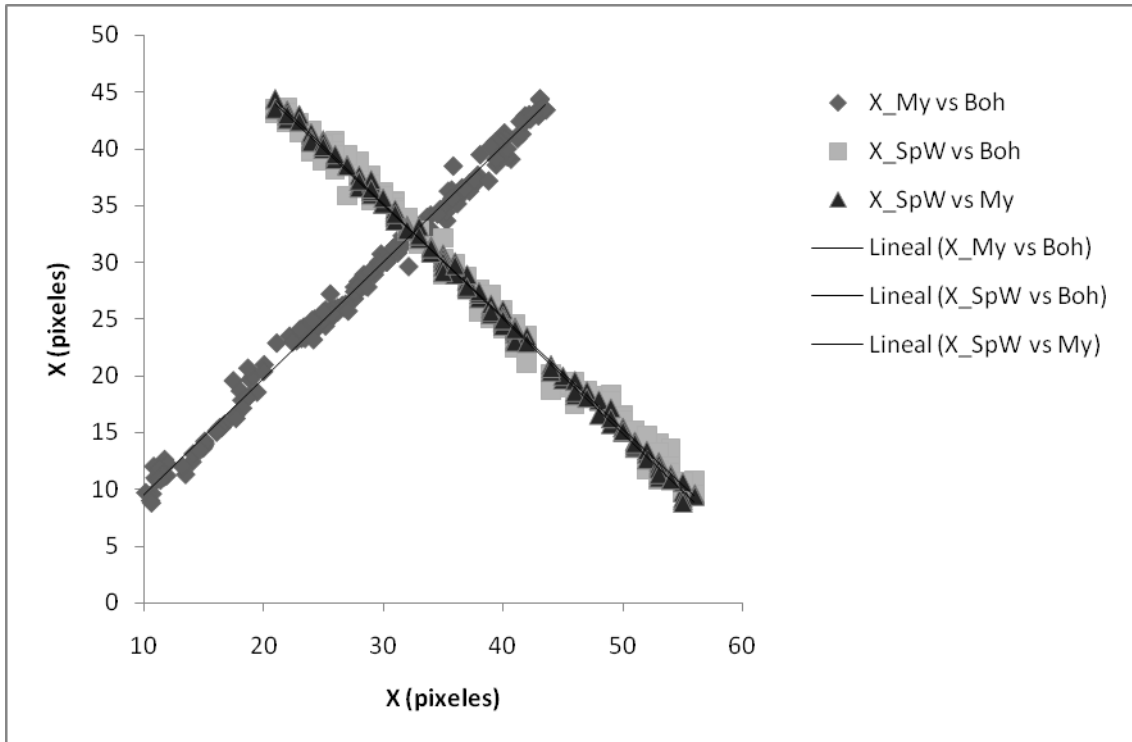


Figura suplementaria 1. Validación de los métodos de rastreo de la trayectoria recorrida por lo espermatozoides. Comparación de las coordenadas X de la trayectoria recorrida por un espermatozoide de *S. purpuratus* durante 1.5 s obtenidas bajo diferentes métodos de rastreo. 1 pixel= 1.52 μm . rastreo manual contra rastreo semiautomático usando BohBoh v3.29 (My vs Boh, $R^2 = 0.9931$); rastreo automático usando Spermware contra rastreo semiautomático usando BohBoh v3.29 (SpW vs Boh, $R^2 = 0.9924$); rastreo automático usando Spermware contra rastreo manual (SpW vs My, $R^2 = 0.9982$).

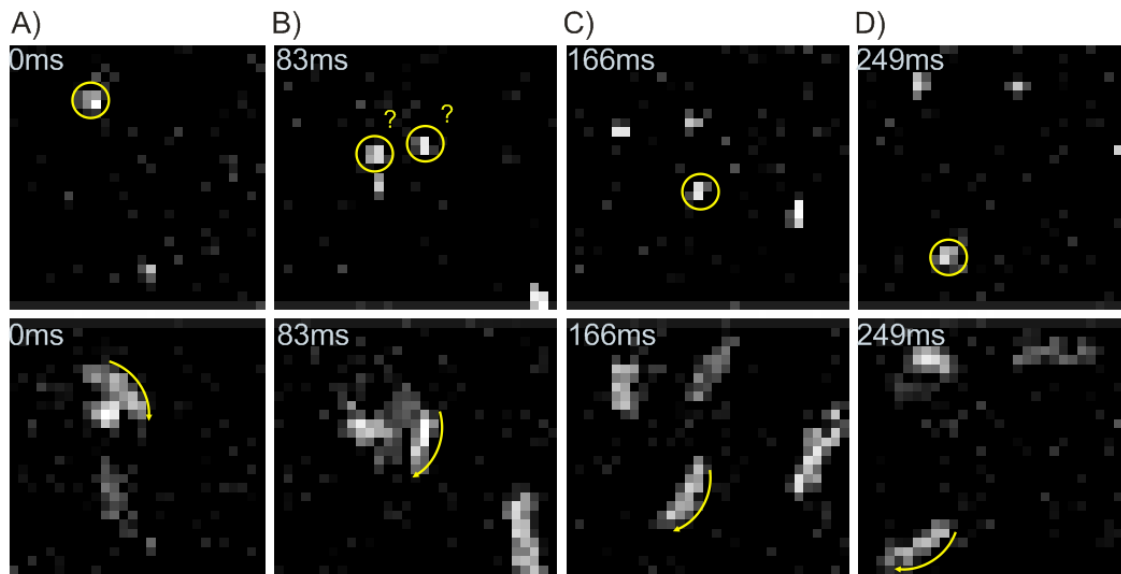


Figura suplementaria 2. Imágenes de apoyo para rastreo de trayectorias de espermatozoides que se entrecruzan. Imágenes correspondientes a los tiempos 0 ms (A), 83 ms (B), 166 ms (C) y 249 ms (D), antes (panel superior) y después de sumar la imagen $n1$ con 10 imágenes posteriores ($n1+n2\dots+n10$) (panel inferior). Espermatozoides de *S. purpuratus* cargados con Fluo-4. El círculo amarillo situado en el panel superior indica la cabeza del espermatozoide a diferentes tiempos (A, B, C, D). Las flechas amarillas a lo largo de la barra en el panel inferior muestran la dirección del espermatozoide. Los signos de interrogación en (B) representan dos posibilidades de rastreo, la decisión entre estas dos la tomé valiéndome de la dirección y trayectoria de la barra del panel inferior. Las imágenes se colectaron cada 8.3 ms.

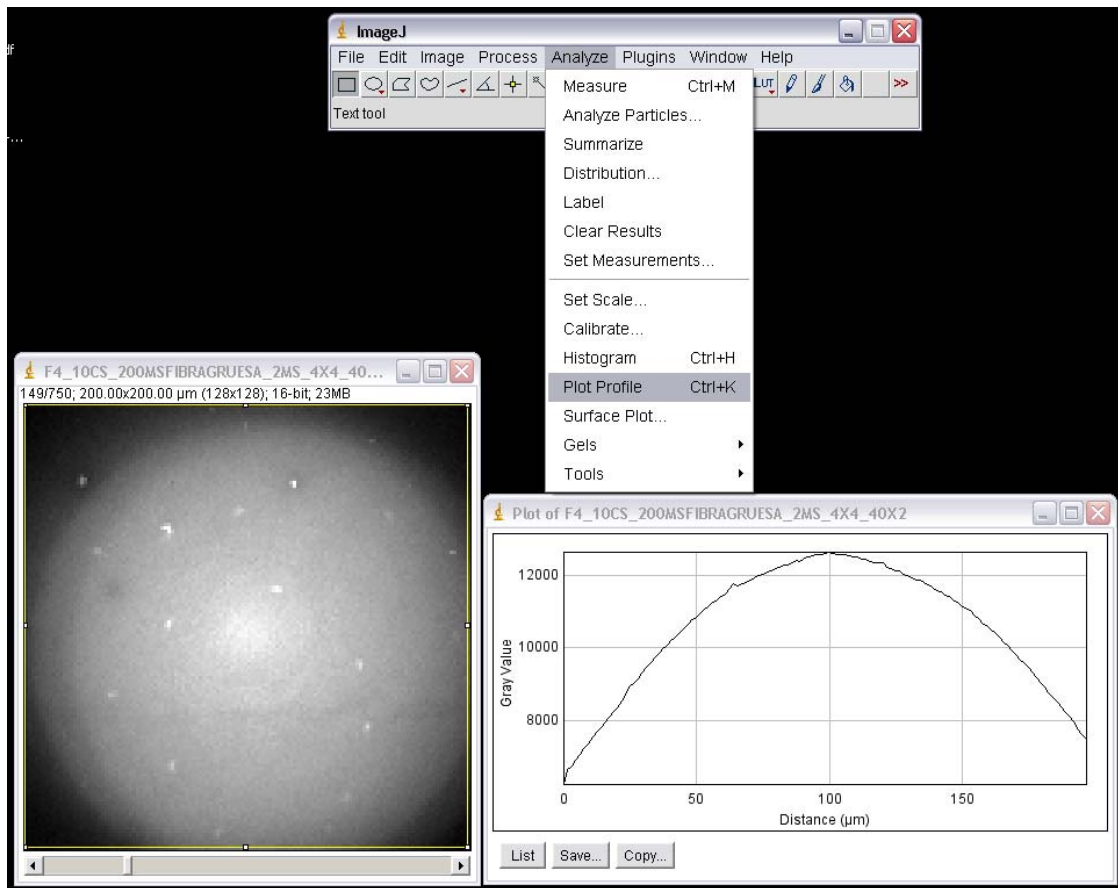


Figura suplementaria 3. El centro del gradiente se obtuvo a través del perfil de intensidad de los pixeles que corresponden al flash de luz UV.

12 BIBLIOGRAFÍA.

1. Cook, S.P., et al., *Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses*. Dev Biol, 1994. 165(1): p. 10-9.
2. Darszon., A., et al., *Sperm Activating Peptides: Regulation of Ion Fluxes, Signal Transduction and Motility*. International Journal of Developmental Biology, 2008. 52: p. 595-606.
3. Wood, C.D., et al., *Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility*. Dev Biol, 2007. 306(2): p. 525-37.
4. Kaupp, U.B., N.D. Kashikar, and I. Weyand, *Mechanisms of Sperm Chemotaxis*. Annu Rev Physiol, 2007.
5. Eisenbach, M., *Sperm chemotaxis*. Rev Reprod, 1999. 4(1): p. 56-66.
6. Miller, R., *Sperm chemo-orientation in the metazoa*, in *Biology of Fertilization*. 1985, Academic: New York.: p. 275-337.
7. Witman, G.B., *Introduction to Cilia and Flagella*. 1990.
8. Wemmer, K.A. and W.F. Marshall, *Flagellar motility: all pull together*. Curr Biol, 2004. 14(23): p. R992-3.
9. Smith, E.F. and P. Yang, *The radial spokes and central apparatus: mechanochemical transducers that regulate flagellar motility*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. 57(1): p. 8-17.
10. Baba, Y.H.a.S.A., *A quantitative analysis of flagellar movement in echinoderm spermatozoa*. J. exp. Biol, 1978. 76: p. 85-104.
11. Brokaw, C.J., *Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella*. J Cell Biol, 1979. 82(2): p. 401-11.
12. Wargo, M.J., M.A. McPeck, and E.F. Smith, *Analysis of microtubule sliding patterns in Chlamydomonas flagellar axonemes reveals dynein activity on specific doublet microtubules*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 12): p. 2533-44.
13. Schackmann, R.W. and P.B. Chock, *Alteration of intracellular [Ca²⁺] in sea urchin sperm by the egg peptide speract. Evidence that increased intracellular Ca²⁺ is coupled to Na⁺ entry and increased intracellular pH*. J Biol Chem, 1986. 261(19): p. 8719-28.
14. Kaupp, U.B., et al., *The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm*. Nat Cell Biol, 2003. 5(2): p. 109-17.
15. Ramarao, C.S. and D.L. Garbers, *Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa*. J Biol Chem, 1985. 260(14): p. 8390-6.

16. Hansbrough, J.R. and D.L. Garbers, *Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin*. J Biol Chem, 1981. 256(5): p. 2235-41.
17. Hansbrough, J.R. and D.L. Garbers, *Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa*. J Biol Chem, 1981. 256(3): p. 1447-52.
18. Babcock, D.F., et al., *Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(13): p. 6001-5.
19. Galindo, B.E., et al., *Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K(+) channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 354(3): p. 668-75.
20. Lee, H.C. and D.L. Garbers, *Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract*. J Biol Chem, 1986. 261(34): p. 16026-32.
21. Strunker, T., et al., *A K(+)-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm*. Nat Cell Biol, 2006. 8(10): p. 1149-1154.
22. Darszon, A., et al., *Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology*. Int Rev Cytol, 2005. 243: p. 79-172.
23. Wood, C.D., A. Darszon, and M. Whitaker, *Speract induces calcium oscillations in the sperm tail*. J Cell Biol, 2003. 161(1): p. 89-101.
24. Wood, C.D., et al., *Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm*. J Cell Biol, 2005. 169(5): p. 725-31.
25. Bohmer, M., et al., *Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm*. Embo J, 2005. 24(15): p. 2741-52.
26. Bohmer M, V.Q., Weyand I, Hagen V, Beyermann M, et al., *Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm*. Embo J., 2005. 24: p. 2741-2752.
27. Sale, W.S., *The axonemal axis and Ca²⁺-induced asymmetry of active microtubule sliding in sea urchin sperm tails*. J Cell Biol, 1986. 102(6): p. 2042-52.
28. Nakano, I., et al., *Central-pair-linked regulation of microtubule sliding by calcium in flagellar axonemes*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 8): p. 1627-36.
29. Tatsu, Y., et al., *A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide*. FEBS Lett, 2002. 525(1-3): p. 20-4.
30. De Giorgi, C., et al., *Complete sequence of the mitochondrial DNA in the sea urchin Arbacia lixula: conserved features of the echinoid mitochondrial genome*. Mol Phylogenet Evol, 1996. 5(2): p. 323-32.

31. Littlewood, D.T. and A.B. Smith, *A combined morphological and molecular phylogeny for sea urchins (Echinoidea: Echinodermata)*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1995. 347(1320): p. 213-34.
32. Ralt, D., et al., *Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors*. Biol Reprod, 1994. 50(4): p. 774-85.
33. Yoshida, M., et al., *A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(23): p. 14831-6.
34. Baba, S.A. and Y. Mogami, *An apporact to digital image analisys of bending shapes of eukaryotic flagella and cilia*. Cell Motility, 1985. 5: p. 475-489.
35. Garbers, D.L. and J.G. Hardman, *Factors released from sea urchin eggs affect cyclic nucleotide metabolism in sperm*. Nature, 1975. 257(5528): p. 677-8.
36. Bentley, J.K. and D.L. Garbers, *Receptor-mediated responses of plasma membranes isolated from Lytechinus pictus spermatozoa*. Biol Reprod, 1986. 35(5): p. 1249-59.
37. Kopf, G.S., D.J. Tubb, and D.L. Garbers, *Activation of sperm respiration by a low molecular weight egg factor and by 8-bromoguanosine 3',5'-monophosphate*. J Biol Chem, 1979. 254(17): p. 8554-60.
38. Garbers, D.L., *Sea urchin sperm guanylate cyclase. Purification and loss of cooperativity*. J Biol Chem, 1976. 251(13): p. 4071-7.
39. Garbers, D.L. and J.G. Hardman, *Effects of egg factors on cyclic nucleotide metabolism in sea urchin sperm*. J Cyclic Nucleotide Res, 1976. 2(2): p. 59-70.
40. Bentley, J.K., A.S. Khatra, and D.L. Garbers, *Receptor-mediated activation of detergent-solubilized guanylate cyclase*. Biol Reprod, 1988. 39(3): p. 639-47.
41. Bentley, J.K., D.J. Tubb, and D.L. Garbers, *Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase*. J Biol Chem, 1986. 261(32): p. 14859-62.
42. Nishigaki, T. and A. Darszon, *Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor*. Dev Biol, 2000. 223(1): p. 17-26.
43. Pacaud, P., et al., *Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture*. Pflugers Arch, 1989. 413(6): p. 629-36.
44. Babcock, R., *Synchronous multispecific spawning on coral reefs: potential for hybridization and roles of gamete recognition*. Reprod Fertil Dev, 1995. 7(4): p. 943-50.

45. Ward, G.E., et al., *Chemotaxis of Arbacia punctulata spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer*. J Cell Biol, 1985. 101(6): p. 2324-9.
46. Yoshida, M., K. Inaba, and M. Morisawa, *Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians Ciona savignyi and Ciona intestinalis*. Dev Biol, 1993. 157(2): p. 497-506.
47. Immler, S., et al., *By Hook or by Crook? Morphometry, Competition and Cooperation in Rodent Sperm*. PLoS ONE, 2007. 2(1): p. e170.
48. Riedel, I.H., K. Kruse, and J. Howard, *A self-organized vortex array of hydrodynamically entrained sperm cells*. Science, 2005. 309(5732): p. 300-3.
49. Miller, R.L. and C.J. Brokaw, *Chemotactic Turning Behaviour of Tubularia Spermatozoa*. J Exp Biol, 1970. 52(3): p. 699-706.
50. Cardullo, R.A., et al., *Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog*. Developmental Biology, 1994. 162(2): p. 600-607.
51. Nishigaki, T., et al., *Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 284(2): p. 531-5.
52. Nishigaki, T., et al., *A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca(2+) before its increase*. Dev Biol, 2004. 272(2): p. 376-88.
53. Corkidi, G., et al., *Tracking sperm in three-dimensions*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 373(1): p. 125-9.
54. Riffell, J.A. and R.K. Zimmer, *Sex and flow: the consequences of fluid shear for sperm egg interactions*. J Exp Biol, 2007. 210(Pt 20): p. 3644-60.