



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Relación entre el Ca^{2+} y la movilidad
quimiotáctica del espermatozoide del erizo de
mar

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

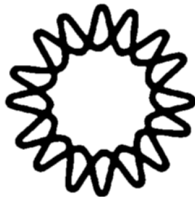
Departamento de Genética del desarrollo y fisiología molecular

PRESENTA:

Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas

DIRECTOR DE TESIS:

Alberto Darszon Israel



Octubre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación se financió por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONA-CyT, 49113, 128566, & 99508), Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN211809 & IN109210) la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-IXTLI, IX200910, IN 111909), el National Institutes of Health (NIH, R01 HD038082-07A1) y la fundación Wellcome Trust.

Dedicado a:

A mi Mama y hermanos, por todo su cariño, por estar siempre presentes y hacerme sentir que el calor de hogar es algo único y especial. Este logro también es de ustedes. GRACIAS!

A mis compañeros y amigos por impulsarme a ser mejor persona día con día. A todas las personas que me apoyaron cuando más lo necesité, en particular a Yuriney quien ha entregado todo de si y ha mostrado que puedo contar con ella incondicionalmente.

Agradecimientos:

A mi tutor, compañero y amigo Beto por su paciencia, su confianza y sobre todo por el ejemplo de vida que siempre ha sido para mi, y continuará siendo.

A mi querido Jorge quien alimenta mi curiosidad con ideas maravillosas, retos científicos y sobretodo por todo su cariño que me motiva a seguir adelante.

A Chris, Tak, Gustavo y Gabriel que me brindaron la oportunidad de compartir esta experiencia tan importante en vida.

Índice

1	Introducción	7
1.1	Mecanismos de propulsión de los espermatozoides	7
1.2	Mecanismos de orientación de los espermatozoides	10
2	Hipótesis	15
2.1	Objetivo general	15
2.2	Objetivos particulares	15
3	Materiales y métodos	17
3.1	Extracción de espermatozoides	17
3.2	Materiales	17
3.3	Incorporación de la sonda fluorescente Fluo-4 a los espermatozoides	18
3.4	Microscopía de epifluorescencia en tiempo real	18
3.5	Procesamiento de imágenes	19
3.6	Rastreo de los espermatozoides e identificación del inicio de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$	19
3.7	Análisis cuantitativo y automatizado de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar	19
3.8	Análisis estadístico	20
4	Resultados	21
4.1	Los espermatozoides detectan la polaridad del gradiente	22
4.2	Alteraciones en la dinámica del calcio intracelular	26
4.2.1	El ácido niflúmico imposibilita la quimiotaxis	27
4.2.2	El ácido niflúmico no afecta el sistema de detección del gradiente de speract	27
4.2.3	El ácido niflúmico incrementa la longitud de arco recorrida por vuelta pero no su duración	32
4.2.4	Los espermatozoides tratados con el ácido niflúmico se desorientan antes de iniciar los periodos de nado recto	33

5	Discusión	35
5.1	Mecanismos moleculares de la quimiotaxis	37
5.2	Alteraciones de la dinámica del calcio impiden la quimiotaxis	39
6	Perspectivas	45
A	Análisis cuantitativo y automatizado de la quimiotaxis	55
A.1	El índice de quimiotaxis LECI	55
A.2	Posicionamiento relativo de los espermatozoides: F1,F	56
A.3	Posicionamiento relativo de los espermatozoides: T1,T & S1,S	56
A.4	La duración de las vueltas/nados rectos	58
A.5	La longitud de arco recorrida por vuelta	59
A.6	Los tiempos de retraso característicos de la quimiotaxis	59
A.7	La velocidad angular durante las vueltas pronunciadas	59
B	Artículos	61
B.1	Artículos publicados en revistas internacionales	61
B.2	Artículos en revisión	63
B.3	Artículos en preparación	63

Resumen

Durante su viaje, el espermatozoide decodifica la información posicional del gameto femenino encriptada en gradientes de señales químicas que difunden desde la gelatina que envuelve al óvulo. Empleando el erizo de mar como modelo experimental dilucidamos el mecanismo molecular mediante el cual el espermatozoide determina la posición del óvulo, se re-orienta y experimenta una respuesta motora dirigida hacia el óvulo (quimiotaxis). Este objetivo se logra mediante la sintonización de flujos iónicos a través de la membrana del flagelo con la polaridad del gradiente del quimioatrayente, lo que conlleva a la regulación espacio-temporal de su aparato motor. Nuestros resultados indican que el Ca^{2+} es un mediador fundamental de todo el proceso y sugieren que los cambios eléctricos de la membrana del flagelo sincronizan la respuesta motora mediante la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Encontramos que la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa cuando el espermatozoide se aleja de la fuente del gradiente del quimioatrayente desencadenando el viraje, la orientación y el nado en línea recta hacia el centro de este. La falla en el acoplamiento entre la polaridad del gradiente del quimioatrayente y la respuesta sensorial - motora imposibilita la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Mecanismos de propulsión de los espermatozoides

La continuidad de la vida de los organismos de reproducción sexual requiere que el espermatozoide encuentre al óvulo y se fusione a él para dar origen a un nuevo individuo. Sin importar la especie, esta labor se lleva a cabo en un ambiente hidrodinámico viscoso carente de inercia (Lauga and Powers, 2009; Purcell, 1977; Reynolds, 1883). El desplazamiento del espermatozoide ocurre gracias al batido continuo de su flagelo, si éste deja de batir el espermatozoide se detiene instantáneamente (Gray, 1953; Gray and Hancock, 1955) (Fig. 1.1). Dentro del flagelo se encuentra una estructura muy conservada (el axonema) encargada de generar la fuerza requerida para que el espermatozoide se impulse contra el medio circundante (Fig. 1.2). El axonema está constituido por un arreglo cilíndrico de nueve pares de microtúbulos que rodean uno central (Gibbons, 1981; Lindemann and Lesich, 2010). Los dobletes externos se interconectan mediante las ligas de nexina y las dineínas (Brokaw, 1989; Gibbons and Rowe, 1965; Porter and Sale, 2000). Las dineínas situadas en el doblete n interactúan transitoriamente con la superficie del doblete $n + 1$. La fuerza generada tras la hidrólisis de ATP impulsa al doblete n hacia la región basal (la base de la cabeza del espermatozoide) y simultáneamente impulsa al doblete $n + 1$ hacia la parte distal del axonema (el final del flagelo) (Sale and Satir, 1977; Vale and Toyoshima, 1988). Si se mira de la base de la cabeza a la punta del flagelo las dineínas siempre extienden sus brazos hacia el doblete adyacente en el sentido de las manecillas del reloj (Gibbons, 1961). Los brazos de dineína alternan su actividad cíclicamente en lados opuestos del axonema. Las estructuras que restringen el deslizamiento de los

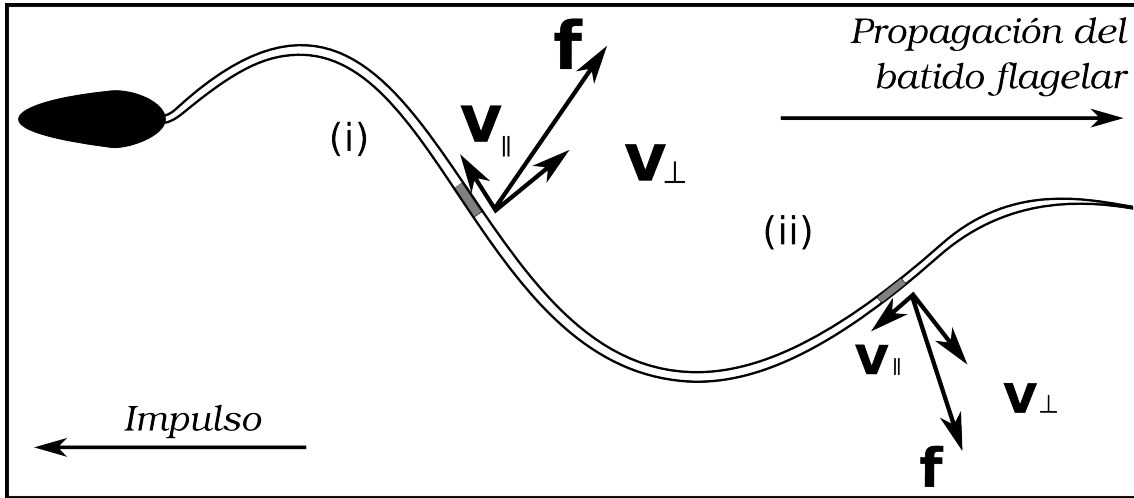


Figura 1.1: Secciones de un flagelo (i) y (ii) durante la propagación de la onda del batido. La velocidad, \vec{v}_i , de cada segmento i del flagelo se puede descomponer en un componente longitudinal, $\vec{v}_{i\parallel}$, y uno normal, $\vec{v}_{i\perp}$. La fuerza ejercida por el fluido sobre cada segmento está dada por $\vec{f}_i = \xi_{\parallel}\vec{v}_{i\parallel} + \xi_{\perp}\vec{v}_{i\perp}$, donde ξ_{\parallel} y ξ_{\perp} son constantes relacionadas a la resistencia al movimiento. Cuando $\xi_{\perp} > \xi_{\parallel}$, la fuerza total ($\sum_i \vec{f}_i$) impulsa al espermatozoide en dirección opuesta a la dirección de la propagación de la onda flagelar. Imagen modificada de (Guerrero et al., 2011a).

microtúbulos (ligas de nexina, proyecciones radiales, anclaje basal donde se origina el flagelo) son las responsables de que las fuerzas resultantes del trabajo de las dineínas doblen y/o tuerzan a el flagelo (Brokaw, 1971, 1972a,b).

El complejo del par central es un regulador fundamental del batido. En la mayoría de las especies, el par central se posiciona perpendicularmente al plano del batido (Afzelius, 1961; Gibbons, 1961), y distribuye las señales que regulan la actividad de las dineínas de acuerdo a su posición en la fase de la propagación de la onda flagelar (Bannai et al., 2000; Nakano et al., 2003; Omoto et al., 1999). Por tanto regula la torsión y el plegamiento del axonema promoviendo la generación y propagación de ondas flagelares semi-planas (Nicastro et al., 2005; Omoto et al., 1999). La generación y propagación del batido flagelar posee un mecanismo de auto regulación que controla la actividad de las dineínas (Brokaw, 2009; Lindemann and Lesich, 2010; Riedel-Kruse et al., 2007). Cuando las dineínas de un lado incrementan su actividad las del otro lado la reducen y vice-versa. Las dineínas asociadas a los dobletes de microtúbulos 1-4 doblan el flagelo en una dirección del ciclo de batido, mientras que las dineínas asociadas a los dobletes 6-9 contribuyen al plegamiento en la dirección opuesta (Fig. 1.2) (Brokaw, 1989; Holwill and Satir, 1994; Nakano et al., 2003; Shingyoji et al., 1977).

Mientras nadan, los espermatozoides tienden a acumularse en las superficies. La asimetría del

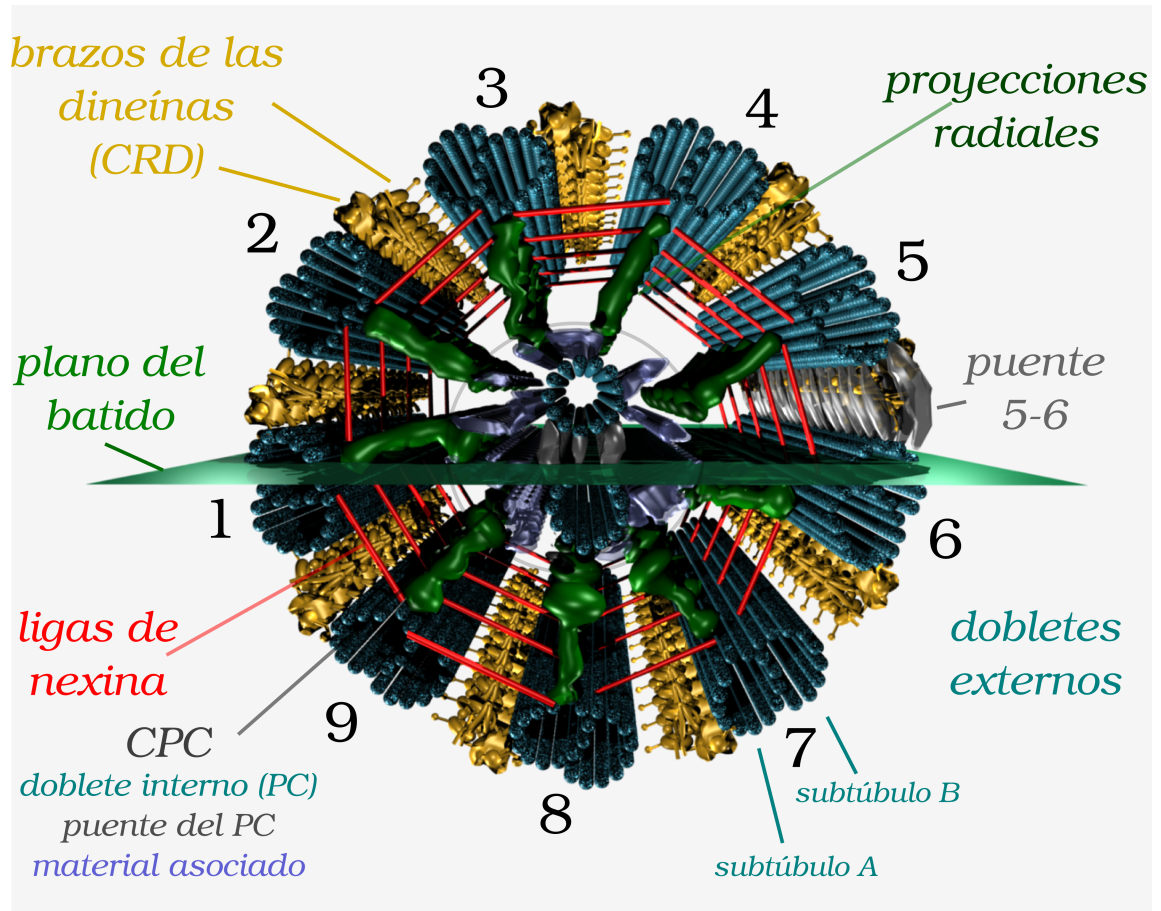


Figura 1.2: Representación 3D de un corte transversal del axonema del espermatozoide del erizo de mar visto en dirección de la cabeza a la punta del flagelo. Excepto por las ligas de nexina y el puente 5-6, todas las estructuras se reconstruyeron a partir de tomografías de microscopía electrónica de especímenes congelados instantáneamente obtenidas por Nicastro y colaboradores (Nicastro et al., 2005, 2006). CRD, complejo regulador de las dineínas, CPC, complejo del par central (PC). Note que los dobles de los microtúbulos 5 y 6 normalmente se encuentran entrelazados (Afzelius, 1959). Creado con blender v2.49b (Guerrero et al., 2011a).

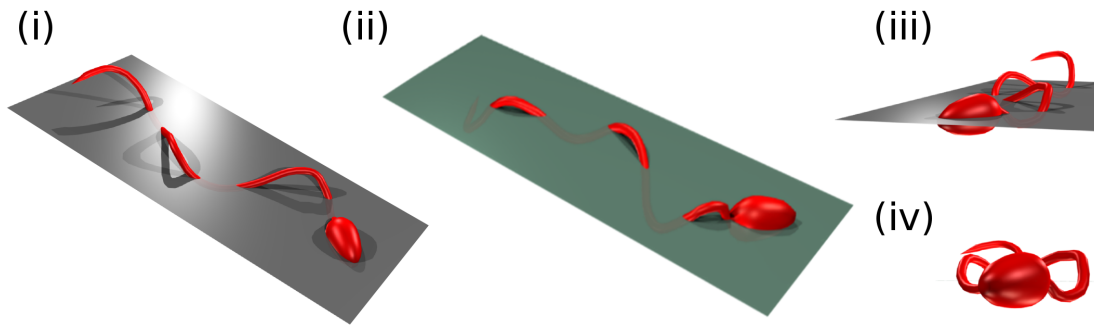


Figura 1.3: Representación 3D de un espermatozoide de erizo de mar que cruza un plano coplanar al plano de batido. Note que este posee una proporción mayoritaria de su flagelo en un lado del plano de batido, compare (i) con (ii), que promueve la generación asimétrica de componentes de fuerza perpendiculares al plano de batido (involucrados en su confinamiento a las superficies). Si se mira desde la cabeza el plegamiento del flagelo crea una forma de 'ocho' (iii. iv). Imágenes creadas con blender v2.49b a partir de las micrografías '2a' y '3d' de (Cosson et al., 2003). Modificado de (Guerrero et al., 2011a).

batido flagelar genera componentes de propulsión perpendicular anisotrópicos que cuando apuntan hacia una superficie dada favorecen el confinamiento (Cosson et al., 2003; Woolley, 2003; Woolley and Vernon, 2001) (Fig. 1.3). Así mismo, la propagación del batido del flagelo genera flujos locales que crean una región de baja presión cerca de la pieza media del flagelo que atrae al espermatozoide a la superficie. El resultado fisiológico del confinamiento es la promoción del contacto con los componentes que envuelven al óvulo (Elgeti et al., 2010; Fauci and McDonald, 1995; Rothschild, 1963; Smith et al., 2009). En resumen, la asimetría intrínseca del axonema favorece la generación alternante de fuerzas anisotrópicas en lados opuestos, los cuales son responsables de la generación y propagación asimétrica de ondas a lo largo del flagelo. Lo anterior trae como consecuencia que, en general, los espermatozoides describan curvas (trayectorias helicoidales en 3D y circulares cerca de las superficies).

1.2 Mecanismos de orientación de los espermatozoides

Estudios teóricos sugieren que el nado helicoidal/circular es una estrategia de muestreo de gradientes de moléculas quimioatrayentes que difunden desde el óvulo. Mientras nadan en un gradiente de quimioatrayente, los espermatozoides experimentan cambios en la intensidad del estímulo detectado $I(t)$ que son función de la forma del gradiente químico, y su velocidad y dirección de nado relativa al

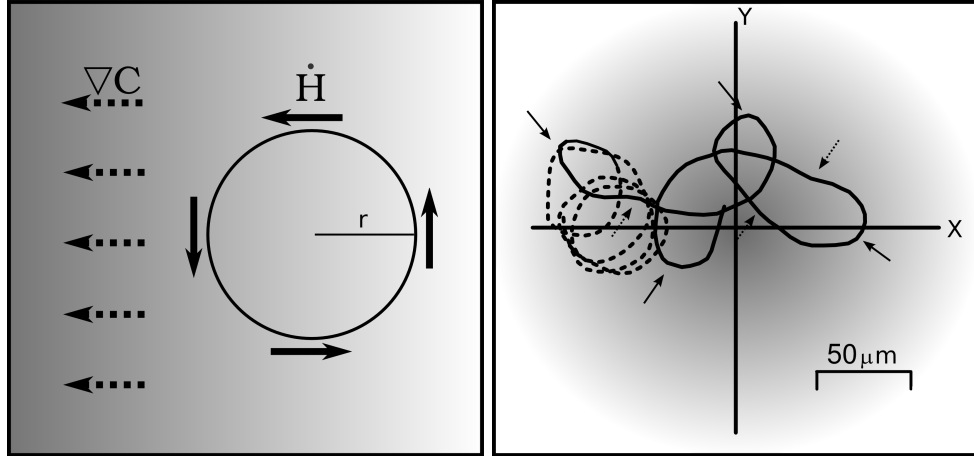


Figura 1.4: El nado circular es una estrategia de orientación eficiente. *Panel izquierdo*: La línea sólida indica la dirección de la velocidad de traslación de un espermatozoide $\vec{H}(t)$, y la línea punteada la dirección del gradiente del quimioatrayente ∇C . Note que cuando $\vec{H}(t) \perp \nabla C$, la intensidad del estímulo es invariante $\dot{I}(t) = 0$. *Panel derecho*: Trayectoria descrita por un espermatozoide de *Lytechinus pictus* antes de ser estimulado (3 s, línea punteada) y después de la exposición a un gradiente del quimioatrayente speract (3.2 s, línea sólida) centrado entre los ejes XY . Durante las vueltas el radio de la trayectoria disminuye (flechas sólidas), e incrementa durante los periodos de nado recto (flechas punteadas). La dirección de nado es en sentido contrario de las manecillas del reloj (Guerrero et al., 2011a).

gradiente quimioatrayente¹. Esta estrategia posee la ventaja de que los espermatozoides requieren muestrear una área pequeña para identificar la dirección donde se encuentra el óvulo²; pero tiene la desventaja de que solo funciona a distancias cercanas al gameto femenino (< 2 diámetros del óvulo ≤ 1 mm, revisado en (Darszon et al., 2008)). Para aliviar este problema los animales marinos liberan simultáneamente billones de gametos para incrementar la tasa de fecundación (ej. cada erizo de mar libera $\sim 10^6$ óvulos, $\sim 10^{10}$ espermatozoides).

Los espermatozoides marinos se orientan al cambiar su dirección de nado de acuerdo a la dirección del (los) gradiente(s) de quimioatrayente(s)¹ (la variación de la intensidad del estímulo \dot{I} es máxima cuando la dirección de la velocidad del espermatozoide \vec{H} es paralela al gradiente del

¹La intensidad del estímulo $I(t)$ detectado por un espermatozoide depende de la forma del gradiente del quimioatrayente ∇C y de la variación de sus parámetros de movimiento de acuerdo a lo siguiente (Crenshaw, 1989, 1990, 1993a,b; Crenshaw and Edelstein-Keshet, 1993):

$$\begin{aligned} I(t) &= \mathcal{F}[C(x, y, z)] , \\ \dot{I}(t) &= \frac{dI}{dt} = \vec{H}(t) \cdot \nabla C(x, y, z). \end{aligned}$$

La primera ecuación describe la intensidad del estímulo detectado por un espermatozoide en la posición $\vec{H}(t)$ como función de la concentración del quimioatrayente C . La segunda ecuación relaciona la variación temporal de la intensidad del estímulo \dot{I} con el alineamiento de la velocidad del espermatozoide \vec{H} de acuerdo a la dirección del gradiente químico.

²Un espermatozoide puede determinar la dirección del gradiente del quimioatrayente en menos de ~ 300 ms tras nadar la mitad de un círculo de radio ~ 25 μm a una velocidad de ~ 250 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Guerrero et al., 2010a).

quimioatrayente \vec{H} , Fig. 1.4 - panel izquierdo). Cerca de las superficies los espermatozoides se orientan al modificar su curvatura de nado κ , incrementándola mientras se alejan del gradiente químico para virar, y disminuyéndola para nadar en línea recta hacia la fuente del quimioatrayente (Fig. 1.4 - panel derecho) (Böhmer et al., 2005; Guerrero et al., 2010a,b; Miller, 1985; Miller and Brokaw, 1970; Shiba et al., 2008). De esta manera, un espermatozoide experimenta orientación positiva si el radio de su trayectoria r es proporcional a la intensidad del estímulo I ; así mismo, experimenta orientación negativa si $r \propto I^{-1}$.

La presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular es un requerimiento estricto para que el espermatozoide se oriente y nade hacia el óvulo (quimiotaxis) (Guerrero et al., 2010a; Kaupp et al., 2003; Wood et al., 2005, 2007; Yoshida et al., 2002). Experimentos con espermatozoides desmembrados mostraron que altas concentraciones de Ca^{2+} ($> 10^{-6}M$) promueven la generación y propagación de ondas asimétricas a lo largo del flagelo; mientras que bajas concentraciones promueven batidos simétricos (Brokaw, 1979). Esto se debe a que altas concentraciones de Ca^{2+} inhiben la actividad de las dineínas situadas en los dobletes 3 y/o 4 del axonema (Nakano et al., 2003). En consecuencia, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ promueve la acumulación de estrés mecánico en el axonema debido al deslizamiento de los microtúbulos en el lado opuesto del axonema resultando en la generación de vueltas pronunciadas. Existe una miríada de proteínas accesorias del axonema que regulan la distribución de las fuerzas generadas a lo largo de este (ej. la calaxina es una proteína que al incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ se une a las dineínas y regula su actividad) (DiPetrillo and Smith, 2009; King, 2010; Mizuno et al., 2009).

En las especies marinas, la unión de los quimioatrayentes a su receptor, situado en la membrana del flagelo del espermatozoide, desencadena una vía de señalización que controla su dirección de nado mediante el disparo regulado de fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1.5) (Böhmer et al., 2005; Guerrero et al., 2010a,b; Shiba et al., 2008). En este trabajo se muestra que el acoplamiento de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ con la forma del gradiente del quimioatrayente es un requisito fundamental de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar (Guerrero, 2011; Guerrero et al., 2010a).

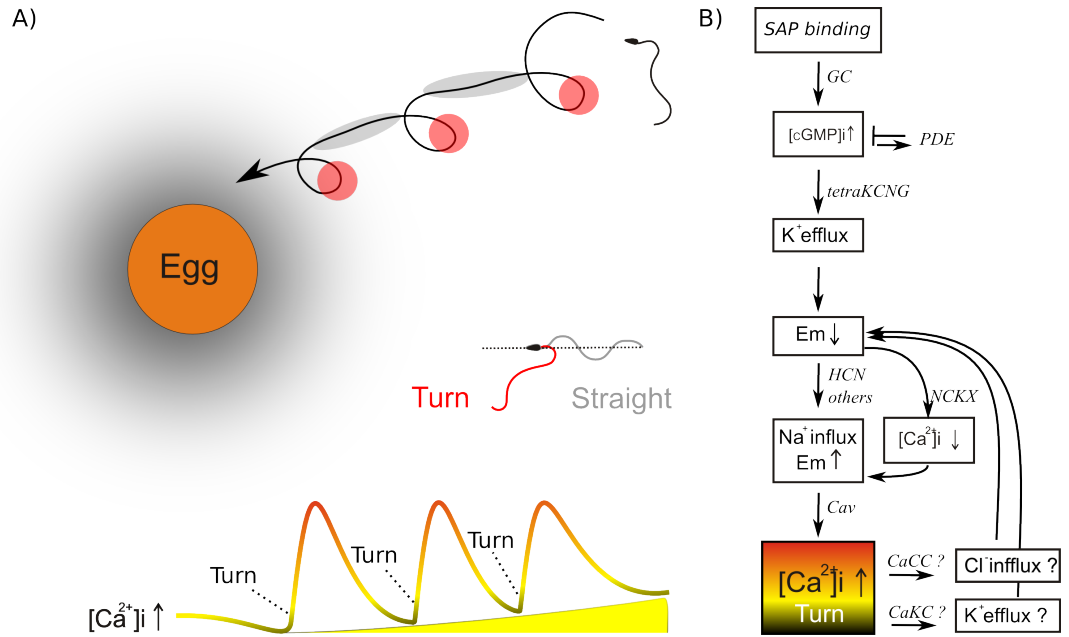


Figura 1.5: Eventos moleculares que controlan la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar. A) La 'gelatina' que envuelve al óvulo contiene péptidos difusivos que regulan la movilidad del espermatozoide (*SAPs*, 'sperm activating peptides') (Suzuki, 1995). B) La unión del *SAP* a su receptor localizado en la membrana del flagelo activa una guanilato ciclasa (*GC*) que incrementa los niveles de *GMPc*, que a su vez hiperpolarizan a la célula mediante la apertura de canales de K^+ regulados por *GMPc* (*KCNG*) (Bönigk et al., 2009; Galindo et al., 2007; Strünker et al., 2006). Lo anterior remueve la inactivación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (*Cavs*), que se abren tras la re/despolarización de la membrana del flagelo. El incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la apertura de los *Cavs* se ha asociado con los incrementos transitorios en la curvatura del flagelo responsables del viraje del espermatozoide (Babcock et al., 1992; Böhmer et al., 2005; Guerrero et al., 2010a,b; Kaupp et al., 2003; Shiba et al., 2008; Wood et al., 2003). Es posible que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ active canales de Cl^- regulados por Ca^{2+} (*CaCC*) y/o canales de K^+ regulados por Ca^{2+} (*CaCK*) que contribuyen a la hiperpolarización del potencial de membrana facilitando la disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ debido al cierre/inactivación de los *Cavs* y la activación de intercambiadores Na^+/Ca^{2+} dependientes de K^+ (*NCKX*). (Darszon et al., 2008; Wood et al., 2007). El mecanismo anterior se repite varias veces generando un tren de fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ que promueven virajes repetidos de la célula intercalados con periodos de nado recto responsables de su re-localización (Guerrero et al., 2011a).

Capítulo 2

Hipótesis

La sincronización espacio-temporal de la vía de señalización desencadenada por el (los) gradiente(s) de quimioatrayerente(s) es un requisito fundamental de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.

2.1 Objetivo general

Dilucidar el (los) mecanismo(s) molecular(s) mediante el (los) cual(es) el espermatozoide determina la posición del óvulo, se orienta y experimenta una respuesta motora dirigida hacia la fuente del quimioatrayerente.

2.2 Objetivos particulares

- Identificar los parámetros fundamentales (cambios intracelulares y respuesta(s) motora(s) asociada(s)) que caracterizan la quimiotaxis.
- Desarrollar un herramienta computacional que cuantifique la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar de manera automatizada, rápida y confiable.
- Alterar el comportamiento de elementos particulares de la vía de señalización y la respuesta motora experimentada por los espermatozoides del erizo de mar ante un gradiente de quimioatrayerente dado.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Extracción de espermatozoides

Los espermatozoides se colectaron de los gonoatoporos de los erizos de mar de *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus* (Marinus Inc., Long Beach, CA, USA) después de la inyección intracelómica de una solución 0.5 M de *KCl*.

3.2 Materiales

El agua de mar se preparó teniendo la siguiente composición (en mM): 486 *NaCl*, 10 *KCl*, 10 *CaCl₂*, 26 *MgCl₂*, 30 *MgSO₄*, 2.5 *NaHCO₃*, 10 *HEPES* y 1 *EDTA* (pH 7.35 para los experimentos con *L. pictus* y pH 8 para los experimentos con *S. purpuratus* (Guerrero et al., 2010a)). El agua de mar con bajo Ca^{2+} se preparó de la misma manera pero a pH 7 y 1 mM *CaCl₂*. El speract enjaulado (CS, [*Ser₅*; nitrobenzyl – Gly₆]*speract*) se sintetizó como se describe en (Tatsu et al., 2002). El Fluo-4 AM y el ácido plurónico F-127 se obtuvieron de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). La polyHEMA (*poly(2 – hydroxyethylmethacrylate)*) y el ácido nifúmico (*2 – [3 – (trifluoromethyl)phenyl]aminopyridine – 3 – carboxylicacid*) fueron de Sigma-Aldrich (Toluca, Edo de Mexico, Mexico).

3.3 Incorporación de la sonda fluorescente Fluo-4 a los espermatozoides

Los espermatozoides recién colectados se diluyeron 10 veces en de agua de mar bajo Ca^{2+} conteniendo 0.2% *peso vol*⁻¹ de ácido plurónico F-127 y 20 μM de Fluo-4 AM, y se incubaron 2.5 hr a 14 °C. Posteriormente se almacenaron en hielo durante el experimento (~ 4 hr).

3.4 Microscopía de epifluorescencia en tiempo real

Los cubreobjetos se sumergieron en una solución 0.1% de poliHEMA¹ (agua : etanol, 1 *vol* : 1 *vol*), se secaron con aire caliente para evaporar el solvente y polimerizar la poliHEMA; se montaron y lavaron en una cámara reusable y ajustable a un controlador de temperatura (TC-202 Bipolar temperature controller; Medical Systems Corp.). La placa se colocó en un microscopio invertido (Eclipse TE-300; Nikon, Tokio, Japón) y se mantuvo a una temperatura constante (15 °C). Los espermatozoides cargados con Fluo-4 se transfirieron a la cámara de registro ($\sim 2 \times 10^5$ *celulas ml*⁻¹). Las imágenes se colectaron a través de un objetivo de fluorescencia (Nikon, Plan Fluor 40 \times 1.3 NA) empleando la combinación de filtros adecuada (ex, HQ470/40 \times ; DC, 505DCXRU; em, HQ510LP) y se registraron con una cámara EM-CCD (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 dicroico M40-DC400 (Rapp Opto Electronic, Hamburg). El LED se sincronizó con la cámara EM-CCD con una caja de control para producir un flash de 2 *ms* por cada exposición. Las imágenes se colectaron con el programa Andor iQ v1.8 (Andor Bioimaging, NC) a 120 *imagenes s*⁻¹ en modo “full-chip”, haciendo una suma espacial de 4 pixeles (*binning* = 4 \times 4, correspondiente a 128 \times 128 pixeles que generan un campo de observación de 200 \times 200 μm , 1 *pixel* = 1.56 \times 1.56 μm). 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 (4 *mm* de diámetro). Una unidad generadora de pulsos TTL (Andor Bioimaging, NC) conectada a un generador de pulsos Master 8 (A.M.P.I., Jerusalén, Israel) disparó la lámpara de UV.

¹un antiadherente que evita que las células se peguen al cubreobjetos

3.5 Procesamiento de imágenes

Se generó una proyección temporal de la intensidad promedio de los píxeles de las primeras 360 imágenes. La imagen resultante se restó a cada una de las imágenes de la película F con la herramienta “image calculator” del programa ImageJ v1.4 (National Institutes of Health, USA) con la finalidad de disminuir la señal del fondo F_0 . La Fig. 4.2 ilustra la proyección temporal de los píxeles mas brillantes cada 3 s (360 imágenes $F - F_0$) antes y después del flash de luz UV.

3.6 Rastreo de los espermatozoides e identificación del inicio de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$

Las trayectorias se obtuvieron tras rastrear la cabeza de los espermatozoides con el ‘plugin’ *MtrackJ* de ImageJ v1.4 (Meijering, 2006). Se determinó la posición del espermatozoide al inicio de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ en el momento en el que se detectó por vez primera la fluorescencia del flagelo (evaluado por inspección visual de las imágenes F) (Guerrero et al., 2010a).

3.7 Análisis cuantitativo y automatizado de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar

En este trabajo se desarrolló un programa en C/C++ llamado *Chemotaxis_{v1(beta)}* que calcula los parámetros siguientes (el algoritmo se describe en el Apéndice 1, (Guerrero, 2011; Guerrero et al., 2011b)):

- El índice de quimiotaxis (*LECI*).

Si $LECI > 0$ el espermatozoide nada hacia el centro del gradiente del quimioatrayente.

- El posicionamiento relativo del espermatozoide en el gradiente del quimioatrayente (ϕ).

Valores de ϕ entre 0 y π identifican espermatozoides que se alejan del centro del gradiente, y valores entre π y 2π identifican espermatozoides que nadan hacia la fuente del quimioatrayente (Fig. A.1).

El programa calcula ϕ al inicio de los 200 ms del flash UV ($\phi_{UVbegin}$), al final de los 200

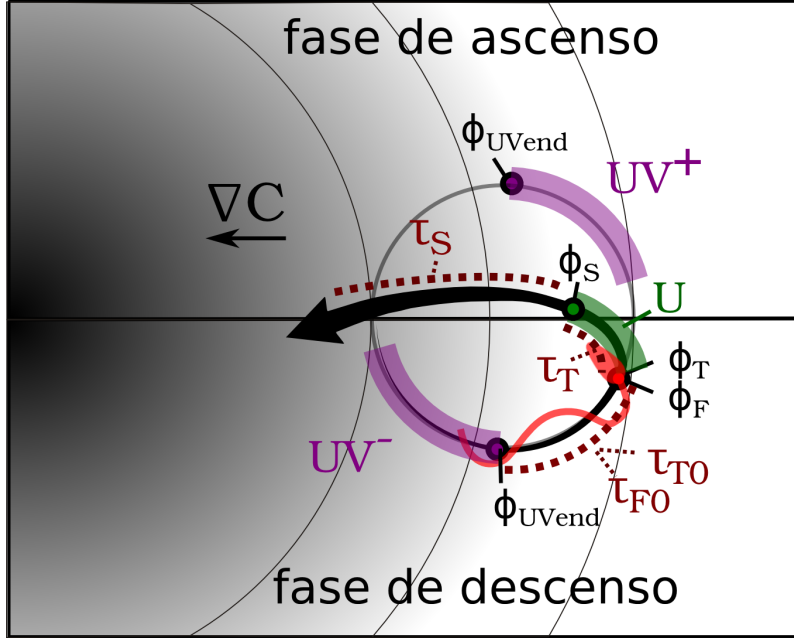


Figura 3.1: Parámetros calculados por *ChemotaxisV1(beta)*. Los espermatozoides que se encontraron en la fase de ascenso del gradiente del quimioatrayente (∇C) al finalizar el periodo de irradiación UV (ϕ_{UVend}) se clasificaron como UV^+ y los espermatozoides que se encontraron en la fase de descenso de ∇C se clasificaron como UV^- .

ms del flash UV (ϕ_{UVend}), al inicio de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (ϕ_F), al inicio de cada vuelta pronunciada (ϕ_T) y al inicio de cada periodo de nado recto (ϕ_S) (Fig. 3.1).

- La duración promedio de las vueltas pronunciadas (τ_T) y de los periodos de nado recto (τ_S) (Fig. 3.1).
- La longitud de arco promedio recorrida durante cada vuelta (U) (Fig. 3.1).
- La velocidad angular durante las vueltas pronunciadas (w_T).
- El tiempo de retraso entre el final del flash de luz UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (τ_{F0}) o a la primera vuelta pronunciada (τ_{T0}) (Fig. 3.1).

3.8 Análisis estadístico

Los datos presentados corresponden al análisis de espermatozoides individuales ($n > 20$) colectados de al menos 3 erizos de mar ($N > 3$), y las barras de error indican el error estándar. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa R v 2.11.1 (R Development Core Team, 2010) y la hipótesis alternativa se aceptó/rechazo considerando un $p < 0.05$.

Capítulo 4

Resultados

La quimiotaxis es un fenómeno mediante el cual se dirige el movimiento de una célula u organismo de acuerdo al gradiente de una molécula presente en el ambiente cercano. Esta está ampliamente descrita en los espermatozoides de invertebrados marinos y tunicados (Miller, 1985). Sin embargo, las bases moleculares que regulan la respuesta motora y que determinan la quimiotaxis no están bien caracterizadas. La gelatina que envuelve al óvulo del erizo de mar contiene factores difusibles llamados péptidos activadores del espermatozoide (*SAPs*, por sus siglas en inglés) que alteran el patrón de nado del espermatozoide (Fig. 1.5 A, revisado en (Darszon et al., 2008)). Uno de ellos, el speract, desencadena en los espermatozoides de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus* alteraciones en el consumo intracelular de O_2 , cambios en el pHi , nucleótidos cíclicos, potencial de membrana, Ca^{2+} , Na^+ , y K^+ intracelular, entre otros (Fig. 1.5 B) (Darszon et al., 2008; Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a,b).

La presencia de un gradiente de speract¹ desencadena en los espermatozoides de *L. pictus* alteraciones en la movilidad que se pueden subdividir en dos fases consecutivas. La primera es una respuesta quimiotáctica que ocurre dentro de una ventana restringida espacio – temporalmente (50–200 μm , 3 s) (Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a). En esta respuesta inicial las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ dirigen la re-localización de cada espermatozoide al promover la generación de vueltas pronunciadas seguidas de periodos de nado recto (Fig. 1.4 - panel derecho). La segunda fase es una respuesta de adaptación carente de fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ y por consiguiente

¹Un gradiente de speract ∇C no - lineal en el centro ($< 50 \mu m$) y lineal en las orillas (50–200 μm) generado mediante la fotoactivación de 10 nM de speract enjaulado (CS) con un haz de luz UV (200ms), ver Fig. 1 en (Guerrero et al., 2010a) para mas detalles experimentales.

también carente de las vueltas pronunciadas y los periodos de nado recto asociados. Durante la fase quimiotáctica el disparo de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ se acopla con la polaridad del gradiente del quimioatrayente favoreciendo que el espermatozoide 'vire' cuando se está alejando de la fuente y posteriormente nade en línea recta hacia ella (Fig. 1.4 - panel derecho).

Bajo las mismas condiciones experimentales¹ el speract induce cambios intracelulares similares en los espermatozoides de *S. purpuratus*, con la diferencia que no experimentan quimiotaxis (Darszon et al., 2008; Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a,b). La ausencia de una respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de *S. purpuratus* está asociada al disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ al azar sin importar el posicionamiento de los espermatozoides en el gradiente del speract. Lo anterior sugiere que la supresión de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de ascenso del gradiente de quimioatrayente es fundamental para la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.

4.1 La polaridad del gradiente químico regula el tiempo de retraso entre la unión del speract a su receptor y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$

Decidimos investigar si el mecanismo de acoplamiento de la vía de señalización con la polaridad del gradiente de speract es robusto mediante el estudio del comportamiento de cada espermatozoide en el periodo entre el flash de UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$. Inicialmente, el incremento en la concentración de speract creado durante los 200 ms de irradiación UV es detectado por todos los espermatozoides presentes en el campo de observación como un gradiente ascendente de speract. Al final del periodo de exposición al flash UV cada espermatozoide va a enfrentarse a un gradiente recién formado ascendente o descendente, dependiendo de su posición y dirección relativa al centro del gradiente². Si el mecanismo mediante el cual se acopla la vía de señalización con la polaridad del gradiente de speract es robusto, las dos poblaciones (los que encuentran un gradiente ascendente al finalizar el flash de UV, o UV^+ , y los que encuentran un gradiente descendente, o UV^-) van a diferir en el tiempo de retraso experimentado previo al inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3.1).

²El gradiente de speract formado es esencialmente fijo en la escala de tiempo que transcurre hasta el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (< 1 s). Coeficiente de difusión del speract $\sim 10^{-6}$ cm^2 s^{-1} .

Los espermatozoides UV^- experimentan una inversión inmediata en el gradiente de quimioatrayente de ascendente a descendente al final del flash de UV (Fig. 3.1), instantáneamente iniciando la cascada de señalización responsable del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Por otro lado, los espermatozoides UV^+ van a continuar nadando en un gradiente ascendente, experimentando un retraso antes de alcanzar el punto de la inversión del gradiente (donde posiblemente se desencadena la cascada de señalización que controla la generación de las vueltas pronunciadas) (Guerrero et al., 2010a). La predicción es que los espermatozoides UV^+ van a experimentar intervalos de mayor duración entre el final del flash de UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$, al compararlos con los espermatozoides UV^- . La hipótesis es que el mecanismo va a preservar la preferencia por generar fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ y las vueltas quimiotácticas asociadas, durante la fase de descenso en el gradiente de quimioatrayente. Un corolario es que en los espermatozoides que carezcan de tal mecanismo, la preferencia por experimentar fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en gradientes descendentes va a estar ausente y por ende el tiempo de retraso entre el final del flash del UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ va a ser el mismo entre espermatozoides UV^+ y UV^- .

De esta manera se determinó la dirección de espermatozoides individuales de *L. pictus* o *S. purpuratus* al final del flash UV usando el ángulo ϕ (ϕ_{UVend}) y se relacionó con el tiempo requerido para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4.1 A, B, D, E; Fig. 3.1). Los valores de ϕ entre 0 y π identifican espermatozoides que nadan en un gradiente descendente, y los valores de ϕ entre π y 2π identifican espermatozoides que nadan en un gradiente ascendente (Fig. A.1).

Los espermatozoides UV^+ de *L. pictus* retardaron el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ en promedio 410 ± 43 ms, mientras que los UV^- mostraron un retraso promedio inferior (162 ± 10 ms, Fig. 4.1 A, B). Por el contrario, en *S. purpuratus* los retrasos promedio para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ mostrados por los espermatozoides UV^+ y UV^- fueron similares (388 ± 36 ms y 383 ± 43 ms; Fig. 4.1 D, E).

El tiempo extendido de los espermatozoides de *L. pictus* UV^+ con respecto a los UV^- probablemente representa el tiempo requerido para alcanzar el punto de transición del gradiente de speract ascendente a uno descendente. En el caso de los espermatozoides de *L. picuts* UV^- este punto se alcanza inmediatamente al finalizar el flash UV. El intervalo residual (~ 200 ms) es posiblemente el tiempo mínimo requerido para la cascada de transducción que conduce al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (ej. un ciclo de hip/dep del potencial de membrana requerido para la apertura de los canales Cav (Babcock et al., 1992; Böhmer et al., 2005; Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a,b; Kaupp et al.,

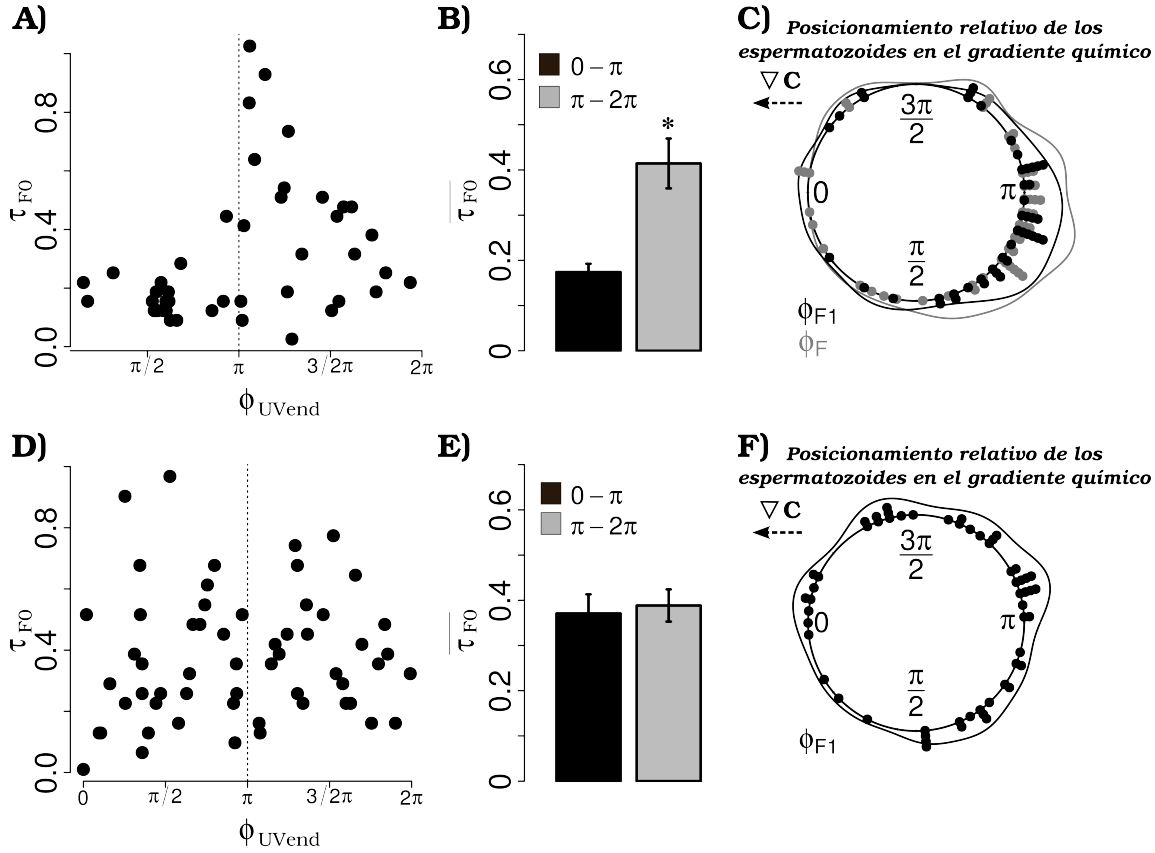


Figura 4.1: Los espermatozoides de *L. pictus* (A-C), no los de *S. purpuratus* (D-F), retardan el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ hasta entrar a una fase de descenso del gradiente de speract. A, D) Relación entre la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract (al final de los 200 ms del flash de UV (ϕ_{UVend}), y el tiempo de retraso para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\tau_{F0}(s)$). B, E) Promedio de los retrasos para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\overline{\tau_{F0}}(s)$) de todos los espermatozoides que cayeron en una fase descendente (negro) o ascendente (gris) del gradiente de speract al final del flash UV (* $p < 0.001$, prueba de Wilcoxon, $n \geq 20$). C, F) Distribución circular de la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract al inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (ϕ_{F1}) o las subsiguientes (ϕ_F), $n \geq 45$.

2003; Shiba et al., 2008; Strünker et al., 2006; Wood et al., 2003)).

Los resultados anteriores conllevan a las siguientes interrogantes: ¿Cuáles son las consecuencias funcionales en la respuesta quimiotáctica del retraso extendido mostrado por los espermatozoides UV^+ de *L. pictus*? ¿Es este tiempo extendido suficiente para retrasar el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ hasta que el espermatozoide entre a una fase de descenso en el gradiente de speract? Para esto se determinó la posición relativa de los espermatozoides con respecto a la dirección del gradiente al inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$, (ϕ_{F1} , Fig. 4.1 C, F; Fig. 3.1).

La distribución circular de los valores ϕ_{F1} de los espermatozoides de *L. pictus* muestra una

Prueba Rayleigh de distribución circular - valores de p					
Dirección específica					
	-	0	$\pi/2$	π	$3\pi/2$
<i>L. pictus</i> ∇C , ϕ_{F1}	0	0	0.93	1	0.07
<i>S. purpuratus</i> ∇C , ϕ_{F1}	0.03	0.008	0.11	0.99	0.89

Tabla 4.1: Los espermatozoides de *S. purpuratus* no detienen el inicio de la 1ª fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de ascenso del gradiente de speract.

Prueba Rayleigh de distribución circular - valores de p					
Dirección específica					
	-	0	$\pi/2$	π	$3\pi/2$
<i>L. pictus</i> ∇C , ϕ_F	0	0	0.98	1	0.02

Tabla 4.2: Los espermatozoides de *L. pictus* experimentan las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ subsecuentes de manera preferencial en el rango $[\pi/2, \pi]$.

tendencia³ de ocurrencia de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ durante el gradiente de speract (∇C) descendente y cercana al punto mas lejano al punto de transición de ascendente a descendente⁴ (Fig. 4.1 C; Tabla 4.1: rango $[\pi/2, \pi]$). Lo anterior indica que el tiempo extendido mostrado por los espermatozoides UV^+ de *L. pictus* es suficiente para retardar el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ hasta que la célula entra a la fase de descenso en el gradiente de speract. Esta conclusión se sustenta también en el hecho que las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ subsecuentes experimentadas por los espermatozoides de *L. pictus* también se suprimen durante la fase de ascenso del gradiente de speract (ϕ_F , Fig. 4.1 C; Tabla 4.2: rango $[\pi/2, \pi]$). Por el contrario, los espermatozoides de *S. purpuratus* no suprimen eficientemente el disparo de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (ni las subsecuentes (Guerrero et al., 2010a)) durante la fase de ascenso del gradiente de speract (Fig. 4.1 C; Tabla 4.1). Lo anterior indica que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la vía de señalización disparada por el speract en los espermatozoides de *S. purpuratus* no se acopla con la polaridad del gradiente del quimioatrayente (lo que sí ocurre en los espermatozoides de *L. pictus*), por tanto explica su falla para experimentar quimiotaxis (Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a).

En conclusión, el acoplamiento del disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ con la polaridad del gradiente del quimioatrayente es un requisito fundamental de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar.

³La hipótesis alternativa es la distribución al azar de los valores ϕ (columna 2 en las tablas 4.1-4.5)

⁴La hipótesis alternativa es la distribución de los valores ϕ hacia una dirección media específica (0, $\pi/2$, π , $3\pi/2$; columnas 3-6 en las tablas 4.1, 4.2)

4.2 Alteraciones en la dinámica de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ impiden la quimiotaxis

El ácido niflúmico (*AN*) es una droga anti-inflamatoria usada ampliamente en el tratamiento de dolor agudo debido a su efecto inhibitor sobre la ciclooxigenasa tipo 2 (Cushman and Cheung, 1976; Vane and Botting, 1998). Esta droga también bloquea y/o modifica la conductancia de varios canales iónico, incluyendo los canales *CaCC*, *CaCK* y *HCN* (Akbarali and Giles, 1993; Cheng and Sanguinetti, 2009; Espinosa et al., 1998; Greenwood and Large, 1995; Hogg et al., 1994; Janssen and Sims, 1992; Pacaud et al., 1989; Satoh and Yamada, 2001; White and Aylwin, 1990). Esta reportado que el *AN* bloquea corrientes de Cl^- activadas por Ca^{2+} en los espermatozoides de mamífero y de erizo de mar (Espinosa et al., 1998; Morales et al., 1993), lo que sugiere que los canales *CaCC* están presentes y son funcionales. Modelos matemáticos recientes, apoyados con estudios farmacológicos, sugieren la participación de los *CaCK* en la vía de señalización del speract; su eliminación/bloqueo modifica la frecuencia de las fluctuaciones $[Ca^{2+}]_i$ y altera su cinética (Espinal et al., 2011). Por otro lado, es bien conocido que los canales *HCN* se encuentran en el espermatozoide del erizo de mar y son funcionales (Galindo et al., 2005; Gauss et al., 1998). Así mismo, hay evidencias experimentales que sugieren que estos últimos participan en la vía de señalización desencadenada por el speract, particularmente durante la fase de re-despolarización previa a la apertura de los canales *CaV* (Nishigaki et al., 2004).

El tratamiento de los espermatozoides de *S. purpuratus* con *AN* (10 – 15 μM) incrementa la duración, amplitud y el intervalo entre las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ desencadenadas por el speract (Wood et al., 2003, 2007). Estas alteraciones repercuten directamente en la movilidad del espermatozoide; favorecen la propagación de un batido altamente asimétrico que promueve la generación de vueltas más pronunciadas que aquellas desencadenadas por el speract solo. Expusimos a los espermatozoides de *L. pictus* a un gradiente de speract solo (∇C), o en la presencia de 30 μM de *AN* ($\nabla C + AN$)⁵; y evaluamos si la alteración de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ afecta la quimiotaxis.

⁵El intervalo de concentración bajo la cual los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el speract en los espermatozoides de *L. pictus* son afectados por el *AN* es 10 μM – 35 μM . Concentraciones superiores promueven que las células dejen de nadar y su $[Ca^{2+}]_i$ se eleve, revisado en (Darszon et al., 2008).

4.2.1 El ácido niflúmico imposibilita la quimiotaxis

En ambas condiciones experimentales, ∇C y $\nabla C + AN$, los espermatozoides nadaron en círculos con un radio casi constante cerca de la interfaz agua/vidrio ($23.8 \pm 0.9 \mu m$ y $26.7 \pm 1.5 \mu m$, respectivamente; $p = 0.27, n > 45$, Prueba de Wilcoxon; Fig. 4.2 A, C); y tras irradiarlos con UV se reubicaron mediante las vueltas pronunciadas seguidas de los periodos de nado recto (Fig. 4.2 B, D).

La quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* al gradiente de speract se cuantificó con el índice $LECI^6$ 3 s antes (control) y 3 s después de la irradiación UV en ambas condiciones experimentales: ∇C y $\nabla C + AN$ (Fig. 4.3). Los resultados obtenidos indican que antes de ser irradiados, los espermatozoides no mostraron ninguna tendencia en su movimiento ($LECI = 1.1 \pm 0.2 \mu m s^{-1}$; $LECI_{AN} = -0.7 \pm 0.6 \mu m s^{-1}$). Sin embargo, al exponerlos al gradiente de speract, los espermatozoides se aproximaron al centro mediante una respuesta quimiotáctica ($LECI_{\nabla C} = 13.5 \pm 2.5 \mu m s^{-1}$), lo cual no ocurrió con los espermatozoides tratados con AN ($LECI_{\nabla C+AN} = -3.0 \pm 2.9 \mu m s^{-1}$) (Fig. 4.3). Lo anterior se puede deber a que el AN perturba el sistema que suprime las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase ascendente del gradiente del speract, o bien, a que afecta el desarrollo de la respuesta motora (las vueltas y/o los periodos de nado recto). A continuación se analizan y describen ambas posibilidades.

4.2.2 El ácido niflúmico no afecta el sistema de detección del gradiente de speract

Para averiguar si el mecanismo que suprime las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en la fase ascendente del gradiente de speract es afectado por el AN se determinó el valor ϕ_{UVend} y se relacionó con el tiempo requerido para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4.4; Fig. 3.1). Los espermatozoides de *L. pictus* UV^+ tratados con AN experimentaron un retraso extendido comparado con los UV^- ($410 \pm 50 ms$ y $200 \pm 50 ms$, respectivamente; Fig. 4.4 A, B); que promovió que el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ se favoreciera durante la fase de descenso del gradiente de speract, cerca del punto más lejano a este (Fig. 4.4 C; Tabla 4.3: rango $[\pi/2, \pi]$). Aunado a esto, la distribución de las posiciones de los espermatozoides de la condición $\nabla C + AN$ al inicio de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ subsecuentes también mostró una tendencia

⁶Valores positivos de $LECI$ indican aproximación vectorial al centro del gradiente del quimioatrayente (Yoshida et al., 2002).

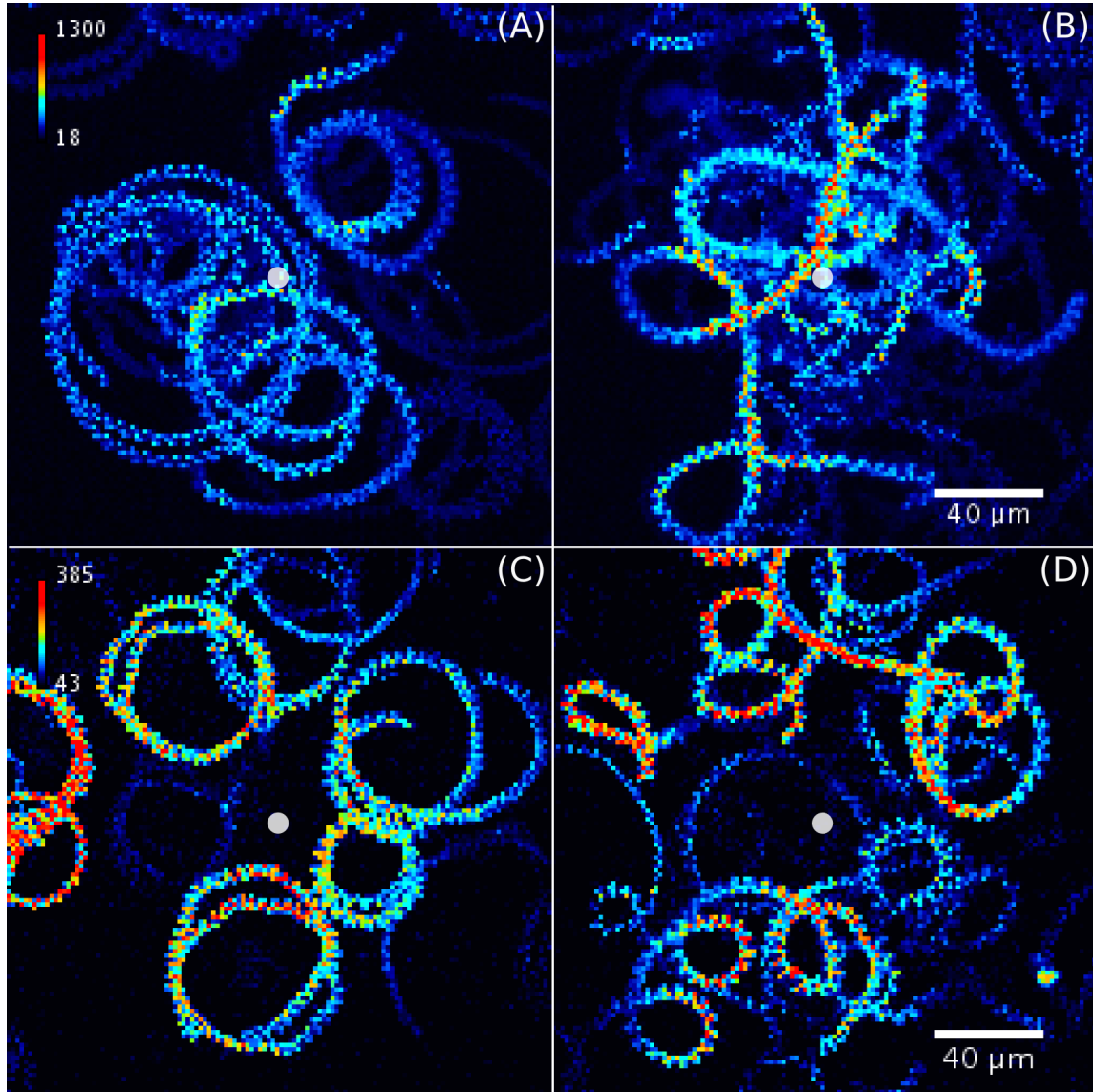


Figura 4.2: Cambios en el patrón de nado experimentados por los espermatozoides de *L. pictus* expuestos solo al speract (A-B) o al speract en presencia del ácido niflúmico (C,D). Proyecciones temporales de las imágenes correspondientes a 3 s antes (A, C) y 3 s (B, D) después de 200 ms de irradiación UV. La escala de pseudo color ilustra la fluorescencia ($F - F_0$) de la cabeza de los espermatozoides. El punto blanco muestra la región más irradiada y corresponde al centro del gradiente de speract.

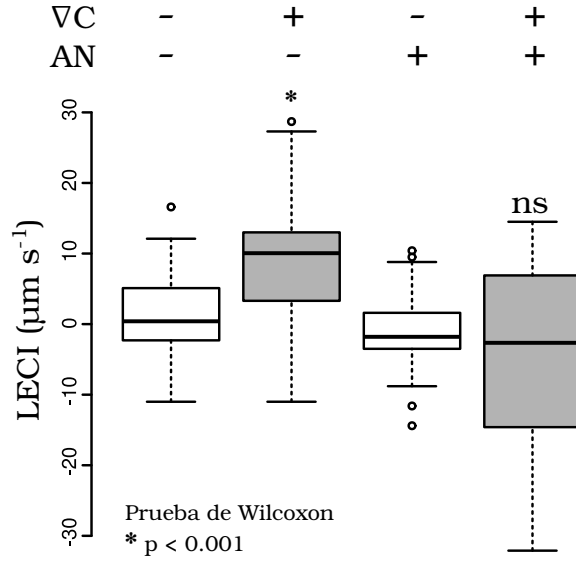


Figura 4.3: El ácido niflúmico imposibilita la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus*. Índice $LECI$ calculado a partir de espermatozoides nadando 3 s antes (blanco) y 3 s después (gris) de la exposición al gradiente de speract solo (∇C) o en presencia de ácido niflúmico ($\nabla C + AN$), $n \geq 20$. Las cajas contienen el 50% de los eventos, la línea interna corresponde a la media y las barras externas delimitan a los valores que caen dentro del intervalo de confianza del 95%.

Prueba Rayleigh de distribución circular - valores de p					
Dirección específica					
	-	0	$\pi/2$	π	$3\pi/2$
$\nabla C + AN, \phi_{F1}$	0	0.0005	1	1	0.047
$\nabla C + AN, \phi_F$	0	0	1	1	0.0005

Tabla 4.3: Los espermatozoides de *L. pictus* tratados con ácido niflúmico experimentan las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ de manera preferencial en el rango $[\pi/2, \pi]$.

hacia el rango $[\pi/2, \pi]$ (Fig. 4.4 C; Tabla 4.3: rango $[\pi/2, \pi]$).

El acoplamiento de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ con la polaridad del gradiente del speract determina el posicionamiento de las vueltas pronunciadas y los periodos de nado recto asociados experimentados por los espermatozoide de *L. pictus*. La Figura 4.5 muestra la relación entre valor ϕ_{UVend} y el tiempo requerido para el inicio de la primera vuelta pronunciada (τ_{T0}) para los espermatozoides de *L. pictus* de las condiciones ∇C (A, B) y $\nabla C + AN$ (D, E). Tal como se esperaba, los espermatozoides UV^+ de ambas condiciones experimentaron un retraso extendido comparado con los UV^- (condición ∇C : 310 ± 43 ms contra 60 ± 43 ms, Fig. 4.5 A, B; condición $\nabla C + CS$: 410 ± 43 ms contra 160 ± 43 ms, Fig. 4.5 D, E). Es interesante notar que en la condición ∇C el valor $\overline{\tau_{T0}}$ es inferior al valor $\overline{\tau_{F0}}$ (compare Fig. 4.1 B con Fig. 4.5 B)⁷. Se examinó si la distribución

⁷ $Chemotaxis_{V1(beta)}$ determina el inicio de las vueltas pronunciadas antes de que la cámara EM-CCD detecte el incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo de los espermatozoides de *L. pictus*. Esto en parte se debe a que los niveles basales de Ca^{2+} son muy bajos (< 200 nM, Fluo - 4 $k_D(Ca^{2+}) = 345$ nM (Gee et al., 2000)) y a que

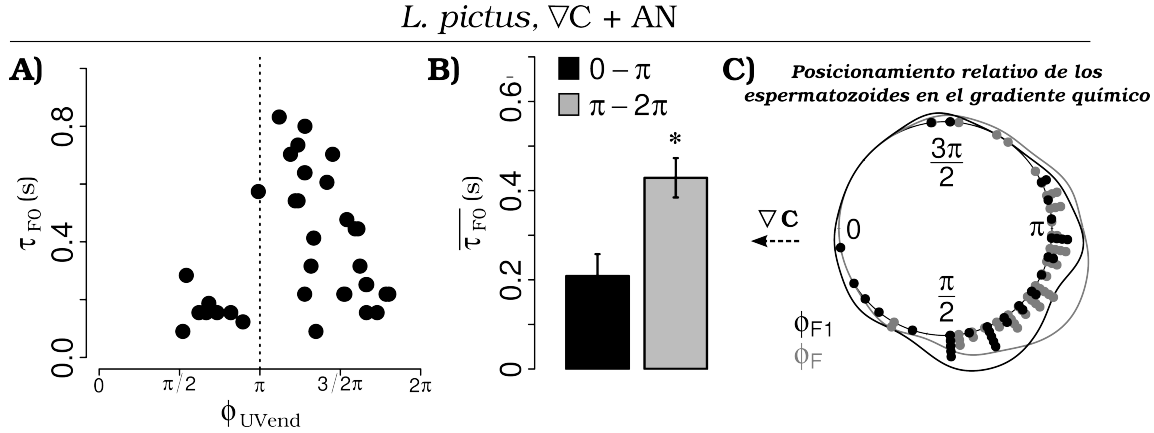


Figura 4.4: El ácido niflúmico no altera el mecanismo que suprime las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en la fase ascendente del gradiente de speract. A) Relación entre la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract de la condición $\nabla C + AN$ (al final de los 200 ms del flash de UV, ϕ_{UVend}) y el tiempo de retraso para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\tau_{F0}(s)$). B) Promedio de los retrasos para el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\overline{\tau_{F0}}(s)$) de todos los espermatozoides que cayeron en una fase descendente (negro) o ascendente (gris) del gradiente de speract al final del flash UV (* $p < 0.001$, prueba de Wilcoxon, $n \geq 9$). C) Distribución circular de la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract al inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (ϕ_{F1}) o las subsecuentes (ϕ_F), $n \geq 36$.

Prueba Rayleigh de distribución circular - valores de p					
	Dirección específica				
	-	0	$\pi/2$	π	$3\pi/2$
∇C , ϕ_{T1}	0.02	0.3	1	0.7	0.04
∇C , ϕ_T	0	0.0004	1	1	0.001
$\nabla C + AN$, ϕ_{T1}	0	0.002	1	1	0.0001
$\nabla C + AN$, ϕ_T	0	0	1	1	0.0001

Tabla 4.4: En ambas condiciones experimentales, ∇C y $\nabla C + AN$, los espermatozoides de *L. pictus* experimentan las vueltas pronunciadas de manera preferencial en el rango $[\pi/2, \pi]$.

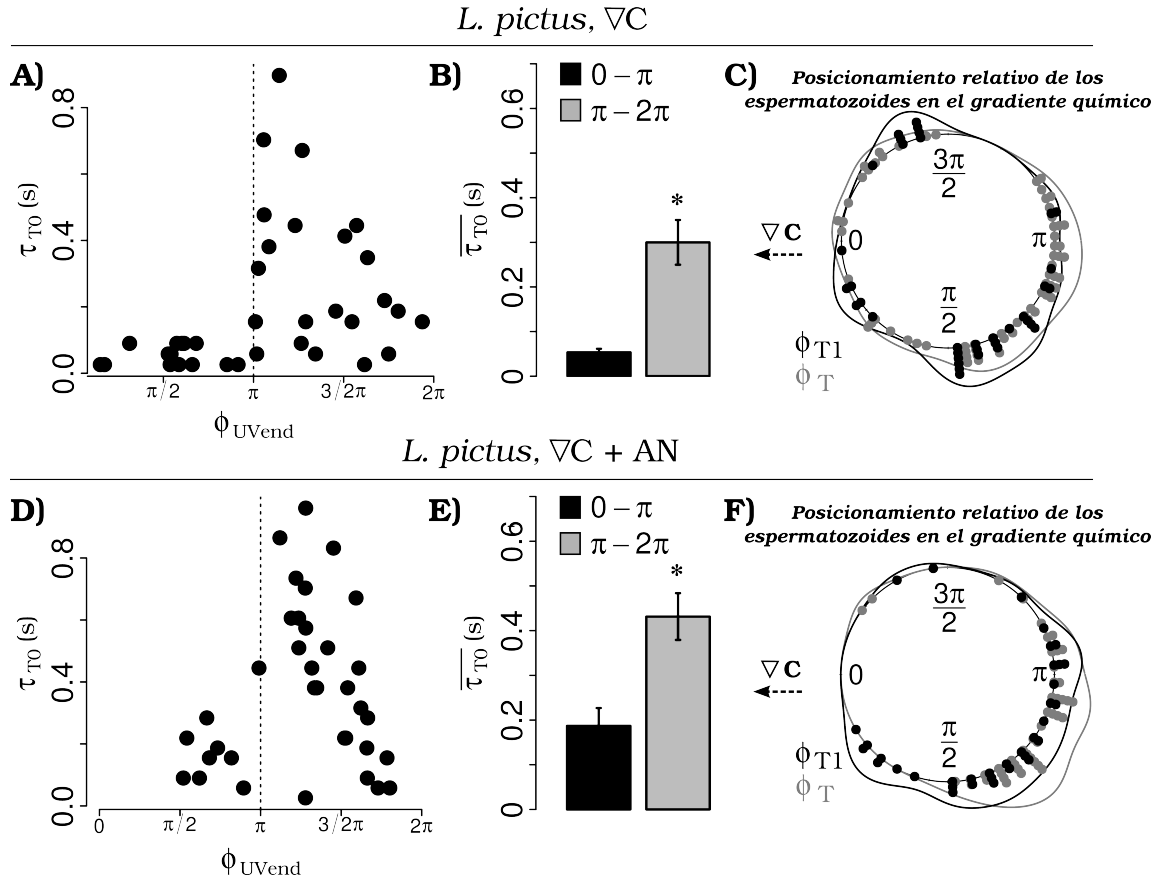


Figura 4.5: Los espermatozoides de *L. pictus* retardan el inicio de la primera vuelta pronunciada hasta entrar a una fase de descenso del gradiente de speract (A-C) sin importar si son expuestos al ácido níflúmico (D-F). A, D) Relación entre la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract (al final de los 200 ms del flash de UV, ϕ_{UVend}) y el tiempo de retraso para el inicio de la primera vuelta pronunciada (τ_{T0} (s)). B, E) Promedio de los retrasos para el inicio de la primera vuelta pronunciada ($\overline{\tau_{T0}}$ (s)) de todos los espermatozoides que cayeron en una fase descendente (negro) o ascendente (gris) del gradiente de speract al final del flash UV (* $p < 0.001$, prueba de Wilcoxon, $n \geq 9$). C, F) Distribución circular de la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract al inicio de la primera vuelta pronunciada (ϕ_{T1}) o las subsecuentes (ϕ_T), $n \geq 35$.

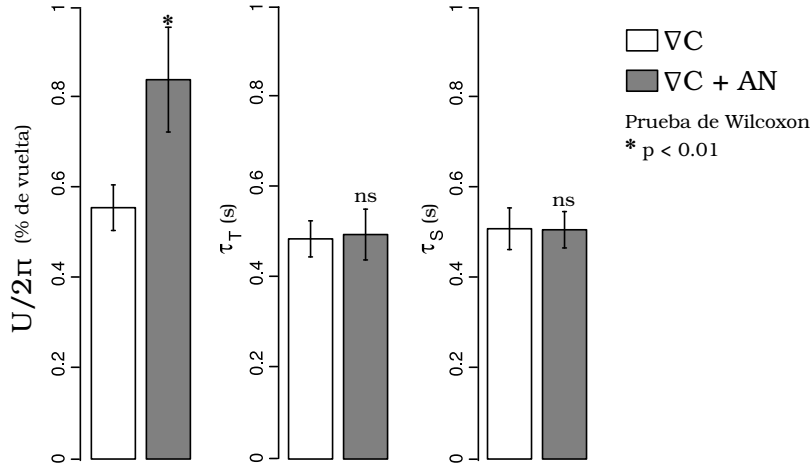


Figura 4.6: El ácido niflúmico incrementa la longitud de arco recorrida por vuelta pero no su duración. Longitud de arco del círculo promedio recorrida por los espermatozoides de *L. pictus* durante los periodos de viraje $U/2\pi$ (% de vuelta) ($n \geq 75$) y la duración media de estos τ_T (s) ($n \geq 75$) al exponerlos a un gradiente de speract solo (∇C) o en la presencia de ácido niflúmico ($\nabla C + AN$). También se ilustra la duración media de los periodos de nado recto τ_S (s) ($n \geq 47$) en ambas condiciones experimentales ∇C y $\nabla C + AN$.

de las posiciones relativas de los espermatozoides al inicio de primera vuelta pronunciada (o las subsecuentes) presentaba alguna tendencia. Los resultados muestran que en ambas condiciones experimentales, ∇C y $\nabla C + AN$, tanto la primera como las subsecuentes vueltas pronunciadas experimentadas por los espermatozoides de *L. pictus* generalmente se suprimen durante la fase de ascenso del gradiente de speract (Fig. 4.5 C; Tabla 4.4).

En resumen, se concluye que el tratamiento con *AN* no afecta el sistema de detección del gradiente de speract.

4.2.3 El ácido niflúmico incrementa la longitud de arco recorrida por vuelta pero no su duración

El papel de las vueltas quimiotácticas es corregir la orientación de los espermatozoides para que hacia la fuente del gradiente del quimiotrayente. Se investigó si la incapacidad de llegar al centro del gradiente del speract que mostraron los espermatozoides tratados con *AN* es ocasionada por fallas durante los periodos de viraje y/o los subsecuentes periodos de nado rectos asociados.

En la presencia de *AN* los espermatozoides recorrieron una distancia mayor durante los periodos de viraje (condición: $\nabla C + AN$: 0.84 ± 0.12 % de vuelta, condición: ∇C : 0.56 ± 0.05 % de vuelta;

estos nadan transitoriamente fuera del plano focal durante la respuesta quimiotáctica al experimentar los periodos de nado recto (Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a).

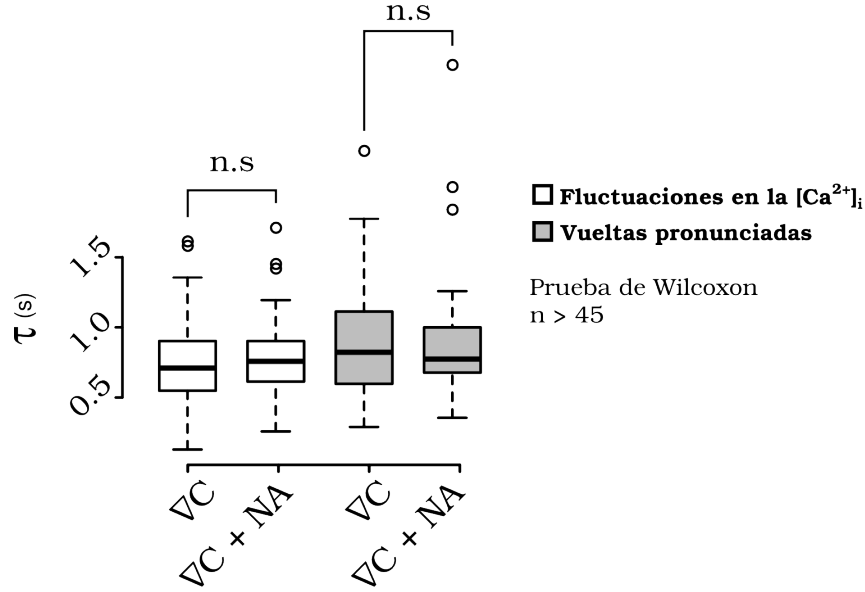


Figura 4.7: El ácido niflúmico no altera el intervalo entre fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, ni el intervalo entre las vueltas pronunciadas. Las cajas contienen el 50% de los eventos, la línea interna corresponde a la media y las barras externas delimitan a los valores que caen dentro del intervalo de confianza del 95%.

Fig. 4.6 - panel izquierdo) en el mismo tiempo ($\tau_T \approx 0.5$ s; Fig. 4.6 - panel central; Fig. 3.1). Lo anterior se debe al incremento en la velocidad angular (w_T) debido al tratamiento con el AN, de 12.7 ± 0.4 a 14.0 ± 0.5 $rad\ s^{-1}$; $p < 0.05$, $n > 70$. Este incremento en w_T fué mas evidente en el primer periodo de viraje (de 12.2 ± 0.4 a 15.4 ± 0.6 $rad\ s^{-1}$, $p < 0.0001$, $n > 40$, Prueba de Wilcoxon). Es interesante notar que el intervalo entre fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ no se modifica por el tratamiento con el AN (∇C : 0.75 ± 0.05 , $\nabla C + AN$: 0.78 ± 0.04 s; Fig. 4.7). Lo mismo ocurrió con el intervalo entre los periodos de viraje (∇C : 0.89 ± 0.05 , $\nabla C + AN$: 0.90 ± 0.07 s; Fig. 4.7). Finalmente, la duración de los periodos de nado recto fue la misma en ambas condiciones experimentales ($\tau_S \approx 0.5$ s; Fig. 4.6 - panel derecho)⁸.

4.2.4 Los espermatozoides tratados con el ácido niflúmico se desorientan antes de iniciar los periodos de nado recto

El incremento en la longitud de arco recorrida por vuelta de los espermatozoides de *L. picuts* tratados con AN sugiere que estos se desorientan durante las vueltas quimiotácticas. Para probar esta hipótesis se determinó el posicionamiento relativo de los espermatozoides en el gradiente de

⁸No se encontraron diferencias significativas entre los valores de U , τ_T , τ_S , de la primera vuelta pronunciada (nado recto) contra las subsecuentes. Los datos presentados en la figura 4.6 corresponden a sus valores promedio.

Posicionamiento relativo de los espermatozoides en el gradiente químico

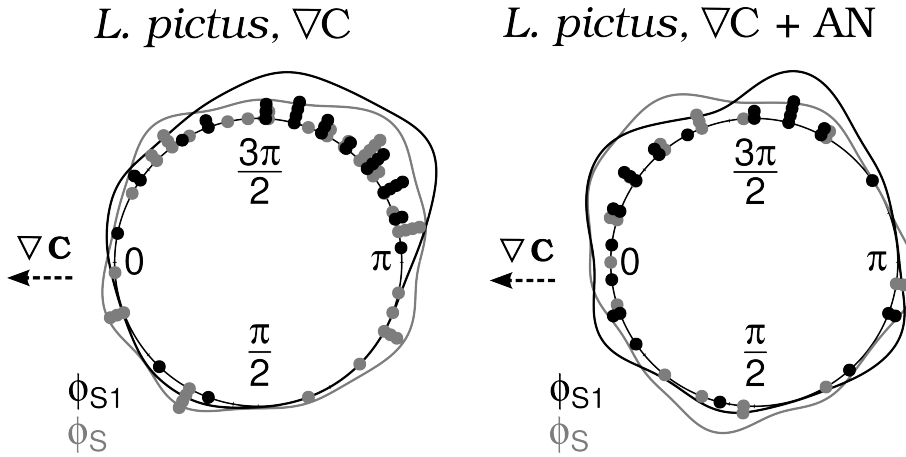


Figura 4.8: Los espermatozoides de *L. pictus* tratados con el ácido niflúmico se desorientan antes de iniciar los periodos de nado recto. Distribución circular de la posición relativa de los espermatozoides en el gradiente de speract al inicio del primer periodo de nado recto (ϕ_{S1}) o los subsecuentes (ϕ_S) en ambas condiciones experimentales, ∇C y $\nabla C + AN$, $n \geq 21$.

	Prueba Rayleigh de distribución circular - valores de p				
	Dirección específica				
	-	0	$\pi/2$	π	$3\pi/2$
$\nabla C, \phi_{S1}$	0	0.02	0	0.98	1
$\nabla C, \phi_S$	0.007	0.03	0.006	0.97	0.99
$\nabla C + AN, \phi_{S1}$	0.01	0.93	0.005	0.07	0.99
$\nabla C + AN, \phi_S$	0.08	0.97	0.12	0.03	0.88

Tabla 4.5: El tratamiento con ácido niflúmico desorienta a los espermatozoides de *L. pictus* antes del inicio de los periodos de nado recto.

speract al inicio de los periodos de nado recto (el primero: ϕ_{S1} , o los subsecuentes: ϕ_S ; Fig. 3.1) en ambas condiciones experimentales ∇C y $\nabla C + AN$ (Fig. 4.8). Mientras que los espermatozoides quimiotácticos experimentan el inicio de los periodos de nado recto al comenzar la fase de ascenso en el gradiente de speract (Fig. 4.8 A; Tabla 4.5, rango $[\pi, 3\pi/2]$), los tratados con *AN* experimentan el inicio de los periodos de nado recto en el rango $[3\pi/2, 2\pi]$ (cerca del punto de inversión del gradiente de speract de ascendente a descendente, Fig. 4.8 B; Tabla 4.5). Estas observaciones indican que el tratamiento con el ácido niflúmico impide la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* debido al posicionamiento erróneo del inicio de los periodos de nado recto en el gradiente del speract.

Capítulo 5

Discusión

Los resultados presentados muestran que el acoplamiento espacio-temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ desencadenados por el speract con la polaridad del gradiente químico es un requisito fundamental para la quimiotaxis de los espermatozoides del erizo de mar de *L. pictus*. Lo anterior favorece el posicionamiento adecuado de la respuesta motora en el gradiente químico (los espermatozoides viran durante la fase de descenso del gradiente del quimioatrayente y nadan recto durante la fase de ascenso). Los espermatozoides quimiotácticos suprimen los incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de ascenso del gradiente del quimioatrayente (Fig. 5.1 - panel izquierdo). La incapacidad para regular el disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de ascenso del gradiente del quimioatrayente promueve la re-localización de los espermatozoides, pero no la respuesta motora dirigida hacia la fuente del quimioatrayente (Fig. 5.1 - panel derecho).

Bajo la misma condición experimental los espermatozoides de *L. pictus* experimentaron quimiotaxis, mientras que los de *S. purpuratus* solo se re-localizaron, aun cuando ambas especies comparten los componentes moleculares que son activados por la unión del speract a su receptor (Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a). Una posible explicación es que estas especies se reproducen en ambientes hidrodinámicos distintos. *L. pictus* habita en los bosques de algas profundas (regiones de baja turbulencia) y *S. purpuratus* en las costas (regiones de turbulencia alta)¹. Es posible que la quimiotaxis no sea una estrategia confiable cuando la turbulencia excede un nivel dado (Riffell and Zimmer, 2007; Zimmer and Riffell, 2011). Otra posibilidad, no excluyente, es que la forma del

¹Ambas especies habitan las penínsulas del océano pacífico de California y Baja California, *L. pictus* un poco más al norte que *S. purpuratus*.

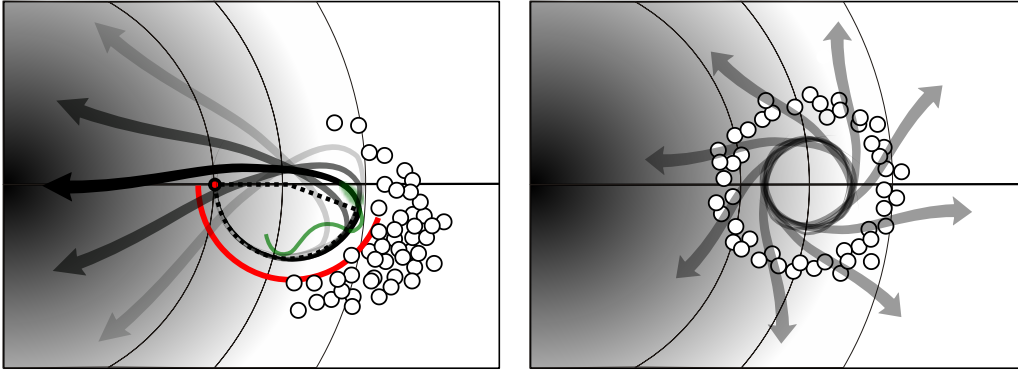


Figura 5.1: *Panel izquierdo:* Un espermatozoide quimiotáctico suprime el disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ mientras nada hacia el centro del gradiente del quimioatrayente hasta que 'detecta' el cambio en la polaridad de éste (círculo rojo). Transcurridos ~ 200 ms la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa justo antes de que la polaridad del gradiente cambie de nuevo (a un gradiente ascendente). En consecuencia el espermatozoide vira para corregir su dirección y posteriormente nada en línea recta hacia la fuente del quimioatrayente (flecha negra). *Panel derecho:* Un espermatozoide no quimiotáctico es incapaz de suprimir las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ mientras nada hacia la fuente del quimioatrayente, por tanto la re-localización mediada por las vueltas pronunciadas seguidas de los periodos de nado recto ocurre al azar. Ambos paneles ilustran la distribución de las posiciones relativas de los espermatozoides en el gradiente del quimioatrayente al inicio de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (círculos blancos).

gradiente² sea un factor determinante para la quimiotaxis de los espermatozoides marinos (Zimmer and Riffell, 2011). También podría ser que los espermatozoides de *S. purpuratus* experimenten quimiotaxis a otro quimioatrayente, o bien, a una mezcla compleja de quimioatrayentes. El speract es solo uno de varios péptidos producidos a partir de modificaciones post-traduccionales del mismo producto génico (Suzuki, 1995). Es posible que tras varias generaciones la naturaleza seleccionó un aparato sensorial - motor capaz de acoplarse a una forma particular del(los) gradiente(s) de quimioatrayente(s)³. Si lo anterior es correcto, la forma del gradiente de (los) quimioatrayente(s) podría contribuir al aislamiento reproductivo de las especies marinas.

²Dependiente del coeficiente de difusión de cada quimioatrayente y del régimen hidrodinámico donde se crea el gradiente.

³Los espermatozoides de *L. pictus* poseen 3 veces más receptores al speract que los de *S. purpuratus* ($6.3 \pm 0.5 \times 10^4$ *celula*⁻¹ y $2.0 \pm 0.9 \times 10^4$ *celula*⁻¹ (Nishigaki and Darszon, 2000; Nishigaki et al., 2001)), nadan más rápido (~ 250 μm *s*⁻¹ contra ~ 150 μm *s*⁻¹), y describen círculos de radio mayor (~ 25 μm contra ~ 15 μm) (Guerrero, 2008; Guerrero et al., 2010a).

5.1 Modelo de los mecanismos moleculares de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar

En 1994 Cook y colaboradores propusieron que los gradientes de quimioatrayentes descendentes elevan la $[Ca^{2+}]_i$ para generar las vueltas quimiotácticas, mientras que los gradientes ascendentes mantienen la $[Ca^{2+}]_i$ baja para que el espermatozoide nade en línea recta hacia el óvulo (Cook et al., 1994). La parte medular del modelo consiste de un ciclo de retroalimentación negativa en el cual la unión del quimioatrayente a su receptor promueve un incremento en la $[GMPc]_i$ causando una hiperpolarización del potencial de membrana V_m mediante la apertura de los *KCNG* (Fig. 1.5 A). La inactivación subsecuente de la *GC* y la disminución de la $[GMPc]_i$ terminan la fase de hiperpolarización, conduciendo a una re-polarización del V_m y la apertura de los canales *Cav* revisado en (Darszon et al., 2008; Guerrero et al., 2010b). En este modelo la quimiotaxis resulta de ciclos hip/dep en el V_m , donde la activación de novo de los receptores de quimioatrayente mantiene el V_m hiperpolarizado, suprimiendo la entrada de Ca^{2+} y favoreciendo los periodos de nado recto. Cuando los espermatozoides entran en un gradiente de quimioatrayente descendente la activación de novo de los receptores decae, lo que promueve la transición del estado hiperpolarizado a uno despolarizado y por consiguiente al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que dispara la vueltas quimiotácticas. Algunos elementos de este mecanismo de regulación aún no se comprenden. Ahora sabemos que los periodos de nado recto coinciden con periodos donde la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene elevada (Darszon et al., 2008; Guerrero et al., 2010a; Wood et al., 2005). Por lo tanto, el modelo propuesto por Cook y colaboradores requiere refinamiento⁴.

Ajustando el modelo anterior, proponemos que la activación de novo de los receptores en gradientes de quimioatrayentes ascendentes conduce a una hiperpolarización extendida del V_m ⁵ que suprime el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ⁶ (Fig. 5.2 i). La hiperpolarización se revierte una vez que el espermatozoide entra en un gradiente de quimioatrayente descendente, donde transcurridos 100–200 ms se desencadena la generación de vueltas quimiotácticas que promueven la re-orientación hacia la fuente del gradiente (en este periodo los canales *Cavs* se abren promoviendo el influjo de Ca^{2+} , Fig. 5.2 ii). En algún punto durante el nado recto, cuando el espermatozoide entra a una fase ascendente en el gradiente de speract, se restablece la hiperpolarización y se sostiene mediante

⁴Vale la pena notar que la unión del speract a su receptor es esencialmente irreversible ($k_{off} \approx 10^{-4} - 10^{-6} s^{-1}$; $k_{on} \approx 10^7 M^{-1} s^{-1}$) (Nishigaki and Darszon, 2000; Nishigaki et al., 2001).

⁵Los canales *KCNG* son exquisitamente sensible al *GMPc* y no presentan inactivación (Bönigk et al., 2009), una propiedad compatible con la generación de periodos de hiperpolarización extendidos.

⁶La hiperpolarización remueve la inactivación los canales *Cav* sin promover su apertura.

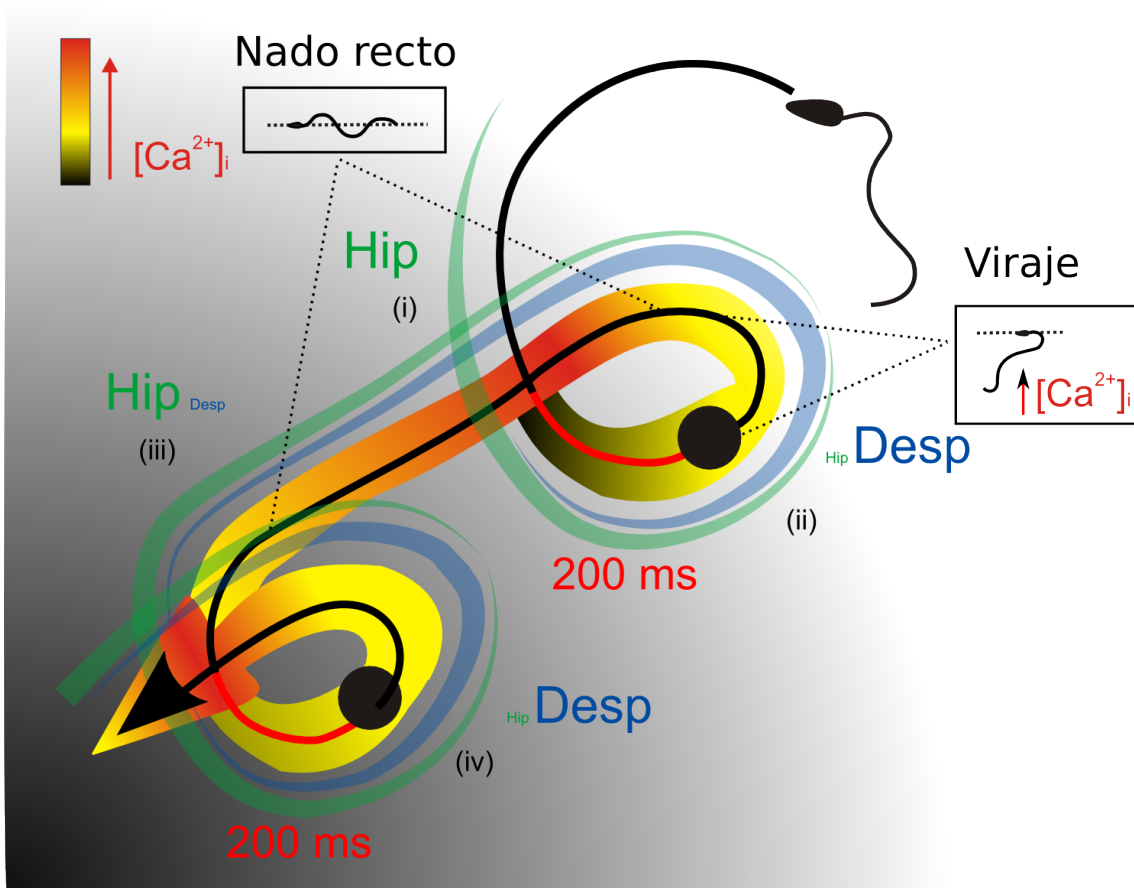


Figura 5.2: Modelo de un espermatozoide de erizo de mar que nada en un gradiente de quimioatrayente (fondo) y experimenta cambios en el V_m (ciclos de hiperpolarización (barra azul) / despolarización (barra verde)) que controlan la actividad de canales Cav . El trazo negro representa la trayectoria descrita por el espermatozoide, el trazo rojo indica los 200 ms de retraso entre el punto de inflexión del gradiente del quimioatrayente y el inicio de la vuelta quimiotáctica. La barra de pseudo color representa la $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo. Modificado de (Guerrero et al., 2011a).

el reclutamiento continuo de receptores de quimioatrayente (Fig. 5.2 iii). Lo anterior, una vez más, se revierte a un estado despolarizado cuando el espermatozoide entra a la fase de descenso del gradiente del quimioatrayente (Fig. 5.2 iv). La descripción anterior explica cómo se podría establecer una secuencia de vueltas quimiotácticas provocadas por ciclos hip/dep del V_m que sirven como transductores primarios de la forma del gradiente del quimioatrayente.

5.2 Alterar con ácido niflúmico la dinámica de las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el speract inhibe la quimiotaxis de los espermatozoides

Los resultados presentados muestran que el tratamiento de los espermatozoides de *L. pictus* con *AN* no altera el mecanismo que suprime las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en la fase ascendente del gradiente de speract. Por lo tanto, los componentes moleculares involucrados en la detección de la polaridad del gradiente de speract (el receptor de speract, la *GC* y los canales *KCNG*) no son afectados por esta droga. Sin embargo, la sensibilidad de la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* al tratamiento con el *AN* sugiere la posibilidad de que los canales *CaCC*, *CaCK* y *HCN* estén presentes y que participen en la regulación de su motilidad (Fig. 5.3).

La hiperpolarización del V_m inicial mediada por la apertura de los *KCNG* remueve la inactivación de los *Cavs* y activa a los *HCN* (Darszon et al., 2008). La apertura de estos últimos se ha asociado a la repolarización que promueve la apertura de los *Cavs*. A concentraciones saturantes de quimioatrayente la hiperpolarización del V_m puede alcanzar el potencial de equilibrio del K^+ $E_K \approx -95$ mV. En los espermatozoides de *Arbacia punctulata* la dependencia de la hiperpolarización con su respectivo quimioatrayente incrementa gradualmente a lo largo de cinco órdenes de magnitud (alcanzado el máximo a 25 nM de *SAP*) (Strünker et al., 2006). Dado que en nuestro sistema experimental empleamos 10 nM de speract enjaulado y que solo el 5 – 10% es activado tras los 200 ms de irradiación UV (en la región de máxima exposición UV) (Tatsu et al., 2002), el gradiente de speract generado debe de estar en el rango picomolar (Guerrero et al., 2010a). Esto implica que la hiperpolarización inicial mediada por la apertura de los *KCNG* debe de estar entre -40 mV⁷ y -95 mV, y necesita ser suficiente para remover la inactivación de los *Cavs*. En este rango de V_m solo una fracción pequeña de los canales *HCN* se abren⁸, promoviendo el influjo de Na^+ y la repolarización inicial requerida para abrir los *Cavs*; el subsecuente influjo de Ca^{2+} contribuye a la despolarización. A 100 μ M el *AN* reduce la corriente activada por hiperpolarización I_h de los canales *HCN* al desplazar su dependencia al V_m a valores más negativos⁹ (Satoh and Yamada, 2001). Dado lo anterior, la corriente I_h va a contribuir en menor medida a la fase de re-despolarización desencadenada por el speract (Fig. 5.3 A - (i)). Considerando lo anterior podemos

⁷El potencial de reposo del espermatozoide del erizo de mar es $E_{rep} \approx -40$ mV (González-Martínez and Darszon, 1987; Schackmann et al., 1981; Strünker et al., 2006).

⁸Los canales *HCN* se encuentran en los espermatozoides del erizo de mar y se ha propuesto que participan en la fase de re-despolarización inicial causada por el speract (Galindo et al., 2005; Gauss et al., 1998).

⁹El ácido niflúmico interactúa con el segmento S4 de los canales *HCN* (Cheng and Sanguinetti, 2009).

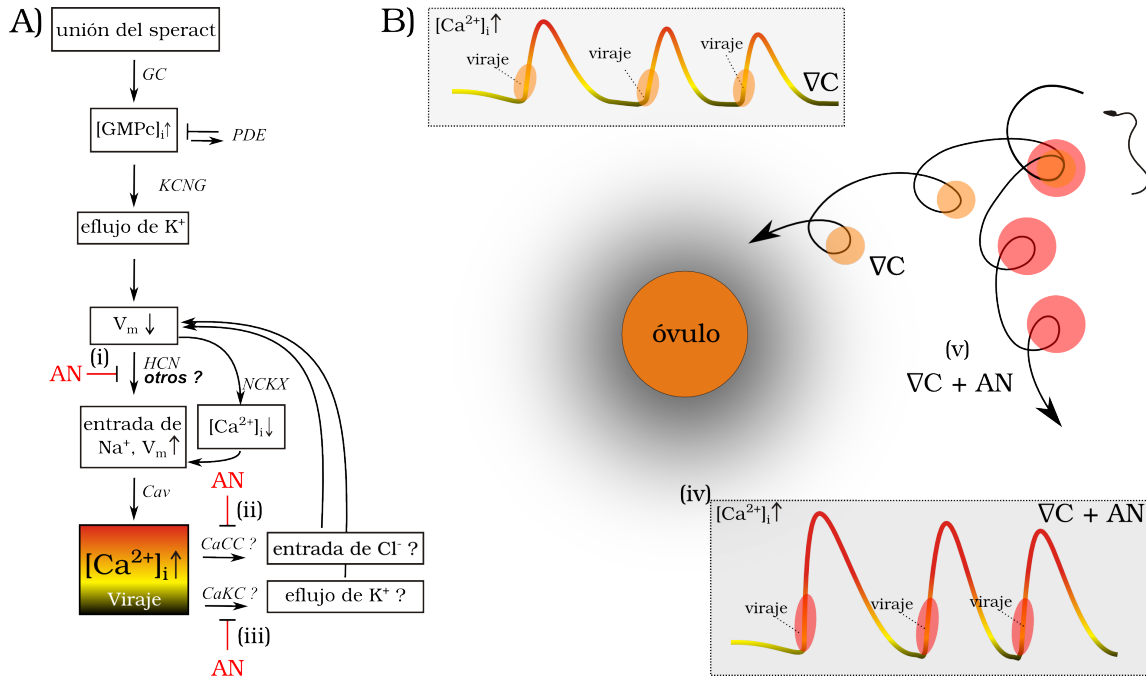


Figura 5.3: Alterar con ácido níflúmico la dinámica de las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el speract modifica el patrón de nado del espermatozoide del erizo de mar e inhibe la quimiotaxis. A) Posibles elementos moleculares alterados por el ácido níflúmico en la vía de señalización del speract; en el rango de 1–100 μM : (i) El AN reduce la corriente activada por hiperpolarización de los canales *HCN* (Cheng and Sanguinetti, 2009; Satoh and Yamada, 2001), pero no bloquea el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Lo anterior sugiere que otros elementos despolarizantes contribuyen a la apertura de los canales *Cav* (Nishigaki et al., 2004). El AN bloquea los canales *CaCC* (Akbarali and Giles, 1993; Espinosa et al., 1998; Greenwood and Large, 1995; Hogg et al., 1994; Janssen and Sims, 1992; Kleene and Gesteland, 1991; Madrid et al., 2005; Morales et al., 1993; Pacaud et al., 1989; White and Aylwin, 1990) y *CaCK* (Greenwood and Large, 1995) en varios tipos celulares. Especulamos que estos canales operan en la vía de señalización del speract y son afectados por el AN. B) Las alteraciones de la cinética de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* inducida por el AN (iv) impiden la quimiotaxis debido al posicionamiento erróneo del inicio de los periodos de nado recto en el gradiente del speract (v).

pensar que otros elementos despolarizadores contribuyen a esta fase (las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ siguen ocurriendo en la presencia del AN). En este contexto la presencia del bloqueador de *HCN* *ZD7288* incrementa el tiempo previo al influjo de Ca^{2+} inicial a través de los *Cavs* disparado por el speract (Nishigaki et al., 2004).

En el espermatozoide del erizo de mar la apertura de canales de Cl^- resultaría en un influjo de este anión¹⁰ y la hiperpolarización del V_m . Si los canales *CaCC* y/o *CaCK* participan en la vía de señalización del speract, podrían responder al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ permitiendo el influjo de Cl^- y/o la salida de K^+ , resultando en la hiperpolarización del V_m (Fig. 5.3 A - (ii,iii)). Esta hiperpolarización podría activar a los *NCKX* que disminuyen la $[Ca^{2+}]_i$, al intercambiar

¹⁰El potencial de equilibrio del Cl^- es $E_{Cl} = -68.5 \pm 7.5 mV$ (Wood et al., 2007).

$3Na^+/2Ca^{2+}$, dándole forma a la fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (Jayantha Gunaratne and Vacquier, 2007; Nishigaki et al., 2004; Su and Vacquier, 2002). Esta hiperpolarización también puede abrir los *HcN*, depolarizando el V_m de nueva cuenta, lo que abre los *Cavs*, y por ende promueve un ciclo de entrada y salida de Ca^{2+} mediante la acción concertada de los *HcN*, *Cavs*, *CaCC* y/o *CaCK*.

En el rango de 1 – 100 μM el *AN* bloquea la corriente de Cl^- mediada por los *CaCC* ($I(Ca)_{Cl}$) en varios tipos celulares (Akbarali and Giles, 1993; Greenwood and Large, 1995; Hogg et al., 1994; Janssen and Sims, 1992; Pacaud et al., 1989; White and Aylwin, 1990), incluyendo algunas células ciliadas olfatorias (Kleene and Gesteland, 1991; Madrid et al., 2005), al interactuar con los canales en el estado abierto. El *AN* también bloquea estas corrientes en espermatozoides de mamíferos y de erizo de mar (Espinosa et al., 1998; Morales et al., 1993). Este compuesto tiene un efecto dual en las corriente de K^+ mediada por los canales *CaCK* ($I(Ca)_K$). A concentraciones $< 100 \mu M$ bloquea la corriente $I(Ca)_K$ y a concentraciones superiores la incrementa (en ambos casos de manera reversible) (Greenwood and Large, 1995). Los canales *CaCC* y *CaCK* se activan por la despolarización del V_m y son modulados por Ca^{2+} . El Ca^{2+} modifica la probabilidad de apertura de los canales *CaCC* y *CaCK* al afectar su dependencia al V_m (Greenwood and Large, 1995). Modelos matemáticos recientes apoyados con estudios farmacológicos sugieren la participación de los *CaCK* en la vía de señalización del speract (su eliminación/bloqueo modifica la frecuencia de las fluctuaciones $[Ca^{2+}]_i$ y altera su cinética) (Espinal et al., 2011). Fisiológicamente, la apertura de estos canales debido al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa que promueve la repolarización/hiperpolarización del V_m en las células excitables.

En los espermatozoides de *S. purpuratus* el *AN* incrementa la amplitud y duración de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ desencadenadas por el speract (Fig. 5.3 B - (iv)) (Wood et al., 2003, 2007). Nuestros resultados indican que la alteración de la cinética de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentada por los espermatozoides de *L. pictus* inducida por el *AN* impide la quimiotaxis debido al posicionamiento erróneo del inicio de los periodos de nado recto en el gradiente del speract. Lo anterior se debe a que los espermatozoides recorren una distancia mayor durante los periodos de viraje (Fig. 5.3 B -(v)). Especulamos que en la presencia del *AN* la corriente $I(Ca)_{Cl}$ y/o la $I(Ca)_K$ está(n) disminuida(s) (Fig. 5.3 A - (ii,iii)), en consecuencia la entrada de Ca^{2+} a través de los *Cavs* incrementa, y por ende el grado de asimetría de flagelo también lo hace. Lo anterior va a promover la generación de virajes extendidos que desorientan a los espermatozoides al iniciar los periodos de nado recto en una posición menos favorable en el gradiente del speract (Fig. 5.3 B -(v)). En este contexto Wood y colaboradores mostraron, en estudios en población,

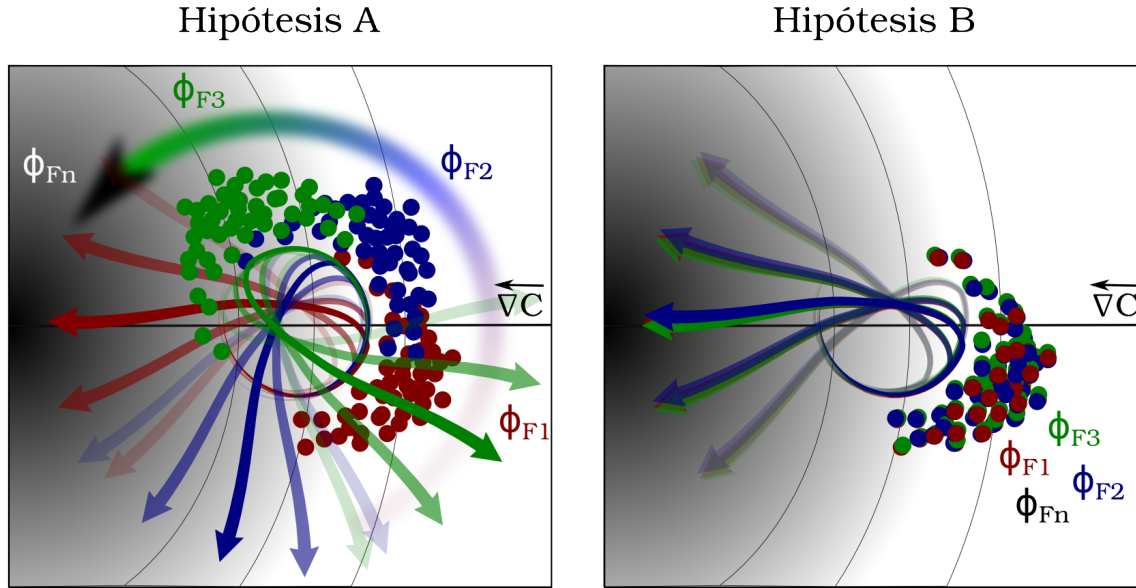


Figura 5.4: Dos escenarios posibles favorecidos por el tratamiento de los espermatozoides con el ácido niflúmico. El posicionamiento relativo de los espermatozoides en el gradiente del quimioatrayente (∇C) al momento de experimentar el inicio de cada una de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\phi_{F1}, \phi_{F2}, \phi_{F3}, \dots, \phi_{Fn}$) puede ser afectada por el AN de alguna de las siguientes maneras. Hipótesis A: El AN podría alterar la frecuencia de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el speract en los espermatozoides, lo que traería como consecuencia el corrimiento de fase del disparo de estas y en consecuencia el posicionamiento erróneo de periodos de viraje dependientes de Ca^{2+} . Hipótesis B: El posible corrimiento de fase del disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el AN podría ser corregido por el reclutamiento continuo de receptores de quimioatrayente. El incremento en la tasa de estimulación de la vía de señalización durante la fase de ascenso del ∇C , comparado con lo ocurrido durante la fase de descenso, podría favorecer un estado 'hiperpolarizado' del V_m capaz de promover un retraso extendido en el disparo de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$. Lo anterior podría favorecer el acoplamiento del inicio de los periodos de viraje dependientes de Ca^{2+} con la polaridad del ∇C .

que el AN incrementa la magnitud de la despolarización del V_m ocasionada por el speract en los espermatozoides de *S. purpuratus* (Wood et al., 2007).

El AN incrementa el periodo entre las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el speract en los espermatozoides de *S. purpuratus* (Wood et al., 2003, 2007). Una propuesta es que la alteración de la frecuencia de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ experimentadas por los espermatozoides de *L. pictus* debido al tratamiento con el AN conlleva al posicionamiento erróneo de los subsecuentes periodos de viraje dependientes de Ca^{2+} (Fig. 5.4 - Hipótesis A). Sin embargo, a diferencia de lo observado con los espermatozoides de *S. purpuratus*, aquellos de *L. pictus* que se expusieron al AN no mostraron incremento en el periodo entre las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. Lo anterior sugiere que, aún en la presencia del AN, los espermatozoides son capaces de integrar la información encriptada en el gradiente de speract y corregir su trayectoria entre cada periodo de viraje mediante alteraciones en

la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$. En otras palabras, los espermatozoides de *L. pictus* experimentan cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de descenso del gradiente del speract independientemente si estos fueron previamente expuesto, o no, al AN. Es posible que el corrimiento de fase del disparo de las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el AN sea corregido por los cambios en la tasa de estimulación debido al reclutamiento continuo de receptores de speract (Fig. 5.4 - Hipótesis B). Si lo anterior es cierto se puede concluir que el patrón de nado del espermatozoide se regula en espacio - tiempo mediante el muestro continuo de los cambios en la concentración del quimioatrayente a través de las cambios en la permeabilidad de la membrana a iones como el Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- y a su ulterior efecto en el axonema. Es esta dinámica de flujos iónicos a través de la membrana del flagelo, la que funciona como intérprete de la información posicional encriptada en la forma del gradiente químico, que finalmente determina la dirección hacia donde tiene que nadar el espermatozoide para encontrarse con el óvulo.

Capítulo 6

Perspectivas

Aunque los espermatozoides de *S. purpuratus* no experimentaron quimiotaxis bajo las condiciones experimentales evaluadas no se descarta la posibilidad de que éste comportamiento tenga un papel fisiológico. Es posible que los espermatozoides de *S. purpuratus* respondan a una forma de gradiente de speract muy particular creada bajo el contexto hidrodinámico donde se reproducen. A corto plazo se pretende evaluar varias formas de gradientes de speract empleando fibras ópticas de diferente grosor, haciendo combinaciones de concentraciones de speract enjaulado y variando el periodo de irradiación UV. A largo plazo se puede hacer uso de dispositivos de microfluidos, o de las cámaras Taylor - Couette (Riffell and Zimmer, 2007; Zimmer and Riffell, 2011), que permitan estudiar el papel de las corrientes en la formación de los gradientes de los quimioatrayentes y sus implicaciones en la quimiotaxis.

La inhibición de la quimiotaxis de los espermatozoides de *L. pictus* por el ácido niflúmico, sin afectar el mecanismo de detección del gradiente del speract, indica que la información posicional del óvulo se traduce en todo momento por la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ al axonema mediante un mecanismo molecular desconocido. El estudio de la relación espacio-temporal entre los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y la curvatura del flagelo proporcionará información valiosa en el entendimiento de la quimiotaxis del espermatozoide marino en un contexto más molecular. Es posible que la estimulación diferencial de segmentos particulares del flagelo debido a su posicionamiento relativo en el gradiente del quimiotrayente tenga un papel importante en la capacidad que tiene cada espermatozoide para orientarse durante su jornada hacia el óvulo.

El análisis presentado se restringe al estudio de la quimiotaxis en la interfaz agua-vidrio, un

ambiente casi bidimensional influenciado por fenómenos de frontera (Guerrero et al., 2011a). En el 2008 desarrollamos un equipo que nos permite rastrear a los espermatozoides en 3D (Corkidi et al., 2008), y recientemente acoplamos a este sistema la infraestructura necesaria para generar gradientes de quimioatrayentes mediante la fotólisis de sus versiones enjauladas. Actualmente estamos caracterizando la quimiotaxis en un contexto 3D, se pretende dilucidar las estrategias motoras empleadas por los espermatozoides para encontrar a los ovocitos en un espacio 3D carente de efectos de frontera.

Bibliografía

- Afzelius, B. (1959). Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative. *J Biophys Biochem Cytol*, 5(2):269–78.
- Afzelius, B. A. (1961). The fine structure of the cilia from ctenophore swimming-plates. *J Biophys Biochem Cytol*, 9:383–94.
- Akbarali, H. I. and Giles, W. R. (1993). Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit oesophageal smooth muscle. *J Physiol*, 460:117–33.
- Babcock, D. F., Bosma, M. M., Battaglia, D. E., and Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K^+ channels by the egg peptide speract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13):6001–5.
- Bannai, H., Yoshimura, M., Takahashi, K., and Shingyoji, C. (2000). Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J Cell Sci*, 113 (Pt 5):831–9.
- Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., and Kaupp, U. B. (2005). Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *EMBO J*, 24(15):2741–52.
- Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., and Kaupp, U. B. (2009). An atypical cng channel activated by a single cgmp molecule controls sperm chemotaxis. *Sci Signal*, 2(94):ra68.
- Brokaw, C. J. (1971). Bend propagation by a sliding filament model for flagella. *J Exp Biol*, 55(2):289–304.
- Brokaw, C. J. (1972a). Computer simulation of flagellar movement. i. demonstration of stable bend propagation and bend initiation by the sliding filament model. *Biophys J*, 12(5):564–86.
- Brokaw, C. J. (1972b). Flagellar movement: a sliding filament model. *Science*, 178(60):455–62.
- Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol*, 82(2):401–11.

- Brokaw, C. J. (1989). Direct measurements of sliding between outer doublet microtubules in swimming sperm flagella. *Science*, 243(4898):1593–6.
- Brokaw, C. J. (2009). Thinking about flagellar oscillation. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8):425–36.
- Cheng, L. and Sanguinetti, M. C. (2009). Niflumic acid alters gating of hcn2 pacemaker channels by interaction with the outer region of s4 voltage sensing domains. *Mol Pharmacol*, 75(5):1210–21.
- Cook, S. P., Brokaw, C. J., Muller, C. H., and Babcock, D. F. (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol*, 165(1):10–9.
- Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C. D., Guerrero, A., and Darszon, A. (2008). Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem Biophys Res Commun*, 373(1):125–9.
- Cosson, J., Huitorel, P., and Gagnon, C. (2003). How spermatozoa come to be confined to surfaces. *Cell Motil Cytoskeleton*, 54(1):56–63.
- Crenshaw, H. C. (1989). Kinematics of helical motion of microorganisms capable of motion with four degrees of freedom. *Biophys J*, 56(5):1029–35.
- Crenshaw, H. C. (1990). Helical orientation: A novel mechanism for the orientation of microorganisms. *Lect. Notes Biomath*, 89:361–386.
- Crenshaw, H. C. (1993a). Orientation by helical motion - I. Kinematics of the helical motion of organisms with up to six degrees of freedom. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55(1):197–212.
- Crenshaw, H. C. (1993b). Orientation by helical motion - III. Microorganisms can orient to stimuli by changing the direction of their rotational velocity. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55(1):231–255.
- Crenshaw, H. C. and Edelstein-Keshet, L. (1993). Orientation by helical motion - II. Changing the direction of the axis of motion. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55(1):213–230.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1976). Effect of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid analogs. *Biochim Biophys Acta*, 424(3):449–59.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., and Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol*, 52(5-6):595–606.
- DiPetrillo, C. and Smith, E. (2009). Calcium regulation of ciliary motility analysis of axonemal calcium-binding proteins. *Methods Cell Biol*, 92:163–80.
- Elgeti, J., Kaupp, U., and Gompper, G. (2010). Hydrodynamics of Sperm Cells near Surfaces. *Biophysical Journal*, 99(4):1018–1026.

- Espinal, J., Aldana, M., Guerrero, A., Wood, C., Darszon, A., and Martínez-Mekler, G. (2011). Discrete dynamics model for the speract-activated Ca^{2+} signaling network relevant to sperm motility. *PLoS One*, 6(8):e22619.
- Espinosa, F., de la Vega-Beltrán, J. L., López-González, I., Delgado, R., Labarca, P., and Darszon, A. (1998). Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl^{-} channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett*, 426(1):47–51.
- Fauci, L. J. and McDonald, A. (1995). Sperm motility in the presence of boundaries. *Bull Math Biol*, 57(5):679–99.
- Galindo, B. E., de la Vega-Beltrán, J. L., Labarca, P., Vacquier, V. D., and Darszon, A. (2007). Sp-tetrakcng: A novel cyclic nucleotide gated K^{+} channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(3):668–75.
- Galindo, B. E., Neill, A. T., and Vacquier, V. D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(1):96–101.
- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685):583–7.
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., and Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2):97–106.
- Gibbons, I. R. (1961). Structural asymmetry in cilia and flagella. *Nature*, 190:1128–9.
- Gibbons, I. R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol*, 91(3 Pt 2):107s–124s.
- Gibbons, I. R. and Rowe, A. J. (1965). Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*, 149(3682):424–6.
- González-Martínez, M. and Darszon, A. (1987). A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett*, 218(2):247–50.
- Gray, J. (1953). Undulatory propulsion. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 94:551–578.
- Gray, J. and Hancock, G. (1955). The propulsion of sea-urchin spermatozoa. *J. exp. Biol*, 32(4):802–814.
- Greenwood, I. A. and Large, W. A. (1995). Comparison of the effects of fenamates on Ca^{2+} -activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 116(7):2939–48.
- Guerrero, A. (2008). Implicaciones de la relación entre los cambios del calcio/curvatura del flagelo en la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar. Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca Mor. Mex.

- Guerrero, A. (2011). Chemotaxis V1 (beta): A C/C++ program for quantitative and automatized analysis of sperm chemotaxis of marine invertebrates.
- Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C. D., Corkidi, G., and Darszon, A. (2011a). Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Mol Hum Reprod*, 17(8):511–23.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C. D., and Darszon, A. (2010a). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Dev Biol*, 344(1):52–65.
- Guerrero, A., Wood, C. D., Nishigaki, T., Carneiro, J., and Darszon, A. (2010b). Tuning sperm chemotaxis. *Biochem Soc Trans*, 38(5):1270–4.
- Guerrero, A., Wood, C. D., Rendón, J. M., Carneiro, J., and Darszon, A. (2011b). Alterations of the ca^{2+} permeability changes triggered by chemoattractants disorient marine spermatozoa. In preparation.
- Hogg, R. C., Wang, Q., and Large, W. A. (1994). Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*, 112(3):977–84.
- Holwill, M. and Satir, P. (1994). Physical model of axonemal splitting. *Cell motility and the cytoskeleton*, 27(4):287–298.
- Janssen, L. J. and Sims, S. M. (1992). Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol*, 453:197–218.
- Jayantha Gunaratne, H. and Vacquier, V. D. (2007). Sequence, annotation and developmental expression of the sea urchin ca^{2+} -atpase family. *Gene*, 397(1-2):67–75.
- Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol*, 5(2):109–17.
- King, S. M. (2010). Sensing the mechanical state of the axoneme and integration of ca^{2+} signaling by outer arm dynein. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(4):207–13.
- Kleene, S. J. and Gesteland, R. C. (1991). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci*, 11(11):3624–9.
- Lauga, E. and Powers, T. (2009). The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Reports on Progress in Physics*, 72:096601.

- Lindemann, C. B. and Lesich, K. A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci*, 123(Pt 4):519–28.
- Madrid, R., Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2005). Cyclic amp cascade mediates the inhibitory odor response of isolated toad olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol*, 94(3):1781–8.
- Meijering, E. (2006). MTrackJ: A Java program for manual object tracking.
- Miller, R. (1985). *Sperm chemo-orientation in the Metazoa.*, volume 2 of *Biology of fertilization*, pages 275–337. Academic Press., New York.
- Miller, R. and Brokaw, C. (1970). Chemotactic turning behaviour of Tubularia spermatozoa. *J. exp. Biol*, 52:699–706.
- Mizuno, K., Padma, P., Konno, A., Satouh, Y., Ogawa, K., and Inaba, K. (2009). A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca^{2+} -dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biol Cell*, 101(2):91–103.
- Morales, E., de la Torre, L., Moy, G. W., Vacquier, V. D., and Darszon, A. (1993). Anion channels in the sea urchin sperm plasma membrane. *Mol Reprod Dev*, 36(2):174–82.
- Nakano, I., Kobayashi, T., Yoshimura, M., and Shingyoji, C. (2003). Central-pair-linked regulation of microtubule sliding by calcium in flagellar axonemes. *J Cell Sci*, 116(Pt 8):1627–36.
- Nicastro, D., McIntosh, J. R., and Baumeister, W. (2005). 3d structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44):15889–94.
- Nicastro, D., Schwartz, C., Pierson, J., Gaudette, R., Porter, M. E., and McIntosh, J. R. (2006). The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 313(5789):944–8.
- Nishigaki, T. and Darszon, A. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. *Dev Biol*, 223(1):17–26.
- Nishigaki, T., Wood, C. D., Tatsu, Y., Yumoto, N., Furuta, T., Elias, D., Shiba, K., Baba, S. A., and Darszon, A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cgmp-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Dev Biol*, 272(2):376–88.
- Nishigaki, T., Zamudio, F. Z., Possani, L. D., and Darszon, A. (2001). Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(2):531–5.
- Omoto, C. K., Gibbons, I. R., Kamiya, R., Shingyoji, C., Takahashi, K., and Witman, G. B. (1999). Rotation of the central pair microtubules in eukaryotic flagella. *Mol Biol Cell*, 10(1):1–4.

- Pacaud, P., Loirand, G., Lavie, J. L., Mironneau, C., and Mironneau, J. (1989). Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch*, 413(6):629–36.
- Porter, M. E. and Sale, W. S. (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J Cell Biol*, 151(5):F37–42.
- Purcell, E. (1977). Life at low Reynolds number. *Am. J. Phys*, 45(3):11.
- R Development Core Team (2010). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Reynolds, O. (1883). An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, pages 935–982.
- Riedel-Kruse, I. H., Hilfinger, A., Howard, J., and Jülicher, F. (2007). How molecular motors shape the flagellar beat. *HFSP J*, 1(3):192–208.
- Riffell, J. A. and Zimmer, R. K. (2007). Sex and flow: the consequences of fluid shear for sperm-egg interactions. *J Exp Biol*, 210(Pt 20):3644–60.
- Rothschild, L. (1963). Non-random distribution of bull spermatozoa in a drop of sperm suspension. *Nature*, 198(1221-1222).
- Sale, W. S. and Satir, P. (1977). Direction of active sliding of microtubules in tetrahymena cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(5):2045–9.
- Satoh, T. O. and Yamada, M. (2001). Niflumic acid reduces the hyperpolarization-activated current (i(h)) in rod photoreceptor cells. *Neurosci Res*, 40(4):375–81.
- Schackmann, R. W., Christen, R., and Shapiro, B. M. (1981). Membrane potential depolarization and increased intracellular ph accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(10):6066–70.
- Shiba, K., Baba, S. A., Inoue, T., and Yoshida, M. (2008). Ca²⁺ bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49):19312–7.
- Shingyoji, C., Murakami, A., and Takahashi, K. (1977). Local reactivation of triton-extracted flagella by iontophoretic application of atp. *Nature*, 265(5591):269–70.
- Smith, D., Gaffney, E., Blake, J., and Kirkman-Brown, J. (2009). Human sperm accumulation near surfaces: a simulation study. *Journal of Fluid Mechanics*, 621:289–320.

- Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J. E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E., and Kaupp, U. B. (2006). A k^+ -selective cgmp-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol*, 8(10):1149–54.
- Su, Y.-H. and Vacquier, V. D. (2002). A flagellar k^+ -dependent na^+/ca^{2+} exchanger keeps ca^{2+} low in sea urchin spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10):6743–8.
- Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoolog Sci*, 12(1):13–27.
- Tatsu, Y., Nishigaki, T., Darszon, A., and Yumoto, N. (2002). A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide. *FEBS Lett*, 525(1-3):20–4.
- Vale, R. D. and Toyoshima, Y. Y. (1988). Rotation and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from tetrahymena cilia. *Cell*, 52(3):459–69.
- Vane, J. R. and Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104(3A):2S–8S; discussion 21S–22S.
- White, M. M. and Aylwin, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of ca^{2+} -activated cl^- channels in xenopus oocytes. *Mol Pharmacol*, 37(5):720–4.
- Wood, C. D., Darszon, A., and Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J Cell Biol*, 161(1):89–101.
- Wood, C. D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S. A., and Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of ca^{2+} in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J Cell Biol*, 169(5):725–31.
- Wood, C. D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S. A., Whitaker, M., and Darszon, A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar ca^{2+} spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol*, 306(2):525–37.
- Woolley, D. M. (2003). Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction*, 126(2):259–70.
- Woolley, D. M. and Vernon, G. G. (2001). A study of helical and planar waves on sea urchin sperm flagella, with a theory of how they are generated. *J Exp Biol*, 204(Pt 7):1333–45.
- Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K., and Morisawa, M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):14831–6.
- Zimmer, R. K. and Riffell, J. A. (2011). Sperm chemotaxis, fluid shear, and the evolution of sexual reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32):13200–5.

Apéndice A

Análisis cuantitativo y automatizado de la quimiotaxis del espermatozoide del erizo de mar

Chemotaxis_{V1(beta)} es una herramienta computacional escrita en C/C++ que cuantifica los parámetros siguientes:

A.1 El índice de quimiotaxis (LECI)

Para cada espermatozoide se calcula su distancia al centro del gradiente del quimioatrayente ($D(t)$) y se obtiene el índice LECI, definido como el valor negativo de la pendiente ($LECI = -M$) de la regresión por mínimos cuadrados ($D = MT + D_0$) de $D(t)$ en el intervalo temporal T . Seleccioné $T = 3$ s debido a que es la ventana bajo la cual los espermatozoides de *L. pictus* experimentan quimiotaxis al gradiente de speract evaluado en (Guerrero et al., 2010a) y en el presente estudio. Valores positivos de LECI indican que el espermatozoide nada hacia el centro del gradiente del quimioatrayente (la región de mayor irradiación UV).

A.2 El posicionamiento relativo del espermatozoide en el gradiente del quimioatrayente al inicio de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$

Para cada espermatozoide respondiendo al quimioatrayente $Chemotaxis_{V1(beta)}$ calcula su posición \vec{P} y dirección \vec{D} con respecto al centro del gradiente químico al inicio de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ y obtiene $\phi(\alpha) : [0, 2\pi)$ de la siguiente manera:

$$\phi(\alpha(t)) = \begin{cases} \pi/2 - \alpha(t) : & \alpha = [\pi/2, 0) \\ \pi/2 + \alpha(t) : & \alpha = [0, \pi) \\ 5\pi/2 - \alpha(t) : & \alpha = [\pi, \pi/2) \end{cases} ,$$

donde $\alpha(t) = \arccos \frac{\vec{P} \cdot \vec{D}}{\|\vec{P}\| \cdot \|\vec{D}\|}$. Los valores de ϕ entre 0 y π identifican espermatozoides que se alejan del centro del gradiente, y los valores entre π y 2π identifican espermatozoides que nadan hacia la fuente del quimioatrayente (Fig. A.1).

$Chemotaxis_{V1(beta)}$ elimina las frecuencias altas de las trayectorias (cabeceo del espermatozoide) con un filtro recursivo de primer orden ($f = 4$ Hz, intervalo de muestreo: $s = 0.01$ s)¹.

$Chemotaxis_{V1(beta)}$ calcula los valores ϕ al inicio de los 200 ms del flash UV ($\phi_{UVbegin}$), al final de los 200 ms del flash UV (ϕ_{UVend}), y al inicio de cada fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (ϕ_F) (Fig. 3.1).

A.3 El posicionamiento relativo del espermatozoide en el gradiente del quimioatrayente al inicio de cada vuelta pronunciada o al inicio de cada periodo de nado recto

El desplazamiento de un espermatozoide se puede representar mediante los cambios locales en la curvatura de la trayectoria de nado κ . Durante las vueltas pronunciadas κ incrementa, y disminuye durante los periodos de nado recto. $Chemotaxis_{V1(beta)}$ calcula $\kappa(t)$ y obtiene ϕ_T y ϕ_S de la

¹ La trayectoria filtrada H_f se genera de la siguiente manera:

$$H_f(x_t, y_t) = A H(x_{t-1}, y_{t-1}) + (1 - A) H(x_{t-1}, y_{t-1}) , \quad (A.1)$$

donde H es la trayectoria sin filtrar y $A = 2 - \cos(2\pi fs) - \sqrt{\cos(2\pi fs)^2 - 4 \cos(2\pi fs) + 3}$.

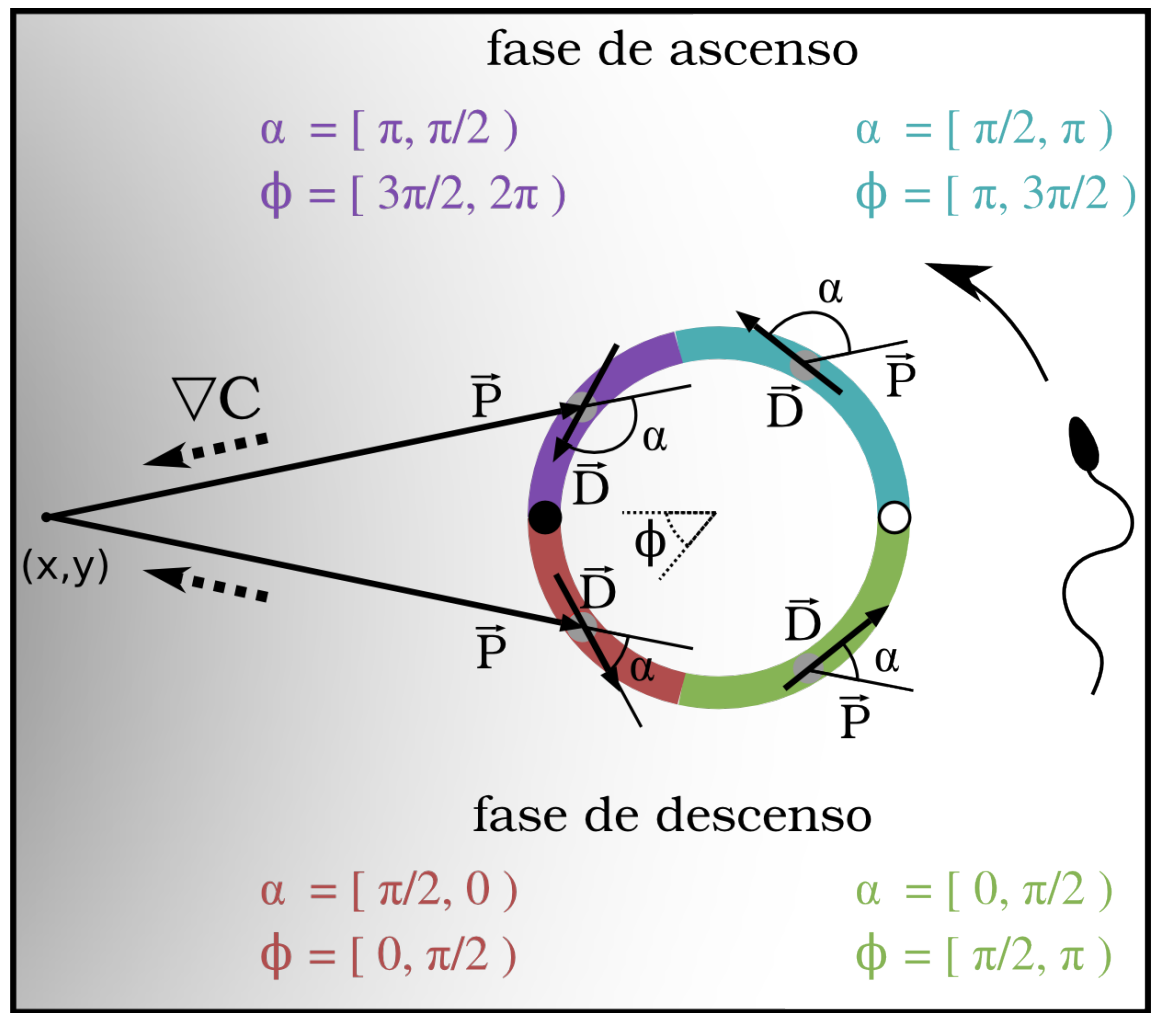


Figura A.1: Dado un espermatozoide que nada en sentido contrario de las manecillas del reloj en el marco de referencia (x, y) situado en el centro del gradiente del quimioatrayente (∇C), que $P(t)$ sea su posición y $D(t)$ su dirección con respecto ∇C , y $\alpha(t) = \arccos \frac{\vec{P} \cdot \vec{D}}{\|\vec{P}\| \cdot \|\vec{D}\|}$ el ángulo formado entre estos dos vectores. Decimos que el espermatozoide nada en la fase de ascenso de ∇C si $\alpha > \pi/2$ (sombreado cian y violeta), de la misma manera decimos que nada en la fase de descenso de ∇C si $\alpha < \pi/2$ (sombreado rojo y verde). Si $\alpha = \pi/2$ el espermatozoide esta atravesando el punto mas cercano (círculo negro) o el mas lejano (círculo blanco) al centro de ∇C . Para discriminar el comportamiento del espermatozoide cercano al centro de ∇C (sombreado violeta y rojo) de su comportamiento cercano al punto mas lejano al centro de ∇C (sombreado verde y cian) se calculó el ángulo $\phi(\alpha) : [0, 2\pi)$. Valores de ϕ entre 0 y π indican que el espermatozoide nada en la fase de descenso de ∇C (sombreado rojo y verde), y valores de ϕ entre π y 2π indican que nada en la fase de ascenso de ∇C (sombreado cian y violeta). Cuando el espermatozoide atraviesa el punto mas cercano al centro de ∇C (círculo negro) entonces $\phi = 0$, y cuando atraviesa el punto mas lejano al centro de ∇C (círculo blanco) entonces $\phi = \pi$.

siguiente manera².

$$\kappa = \frac{\dot{x}\ddot{y} - \dot{y}\ddot{x}}{(\dot{x}^2 + \dot{y}^2)^{3/2}}.$$

*Chemotaxis*_{V1(beta)} obtiene la Transformada de Fourier Discreta (*TFD*) de κ , elimina los componentes de alta frecuencia en el espacio de fase (> 40 Hz, dejando intactos los componentes que definen las vueltas pronunciadas y los periodos de nado recto), y realiza la *TFD* inversa que corresponde a la curvatura filtrada.

Dada una trayectoria H y κ su curvatura, que $\bar{\kappa}$ sea la curvatura media y c una constante arbitraria³. Decimos que H tiene una vuelta pronunciada en el intervalo $Turn = [a, b]$, alrededor de $t \in Turn$, si $\bar{\kappa} + c < \kappa(t) \forall t \in Turn$. De la misma manera, decimos que H tiene un periodo de nado recto en el intervalo $Run = [a', b']$, alrededor de $t \in Run$, si $\bar{\kappa} - c > \kappa(t) \forall t \in Run$.

*Chemotaxis*_{V1(beta)} calcula el posicionamiento relativo del espermatozoide en el gradiente del quimioatrayente al inicio de la primera vuelta pronunciada $\phi_{T1} = \phi(a_1)$, y al inicio de cada una de las subsecuentes $\phi_T = (\phi_{T2}, \phi_{T3}, \dots, \phi_{Tn})$. De la misma manera, calcula el posicionamiento relativo del espermatozoide en el gradiente del quimioatrayente al inicio del primer periodo de nado recto $\phi_{S1} = \phi(a'_1)$, y al inicio de cada uno de los subsecuentes $\phi_S = (\phi_{S2}, \phi_{S3}, \dots, \phi_{Sn})$ (Fig. 3.1).

A.4 La duración de cada vuelta pronunciada (τ_T) y la duración de cada periodo de nado recto (τ_S)

$$\tau_T = b - a ; \quad \tau_S = b' - a' ,$$

donde a, a' y b, b' indican el inicio y el final de cada vuelta pronunciada o periodo de nado recto (Fig. 3.1).

² \dot{x}, \dot{y} corresponden a la primera derivada en el tiempo y \ddot{x}, \ddot{y} a la segunda derivada en el tiempo.

³ $c = 7$ se (se es el error estándar de κ durante la respuesta al quimioatrayente), obtenida a través de la búsqueda del valor máximo de correlación de Pearson R^2 de τ_{F0} contra τ_{T0} empleando diferentes valores (0 se, 0.5 se, 1 se, ..., 10 se). τ_{F0} es el tiempo de retraso entre el final del flash de luz UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (determinado por inspección visual de las películas grabadas con la cámara EM-CCD), y τ_{T0} es el tiempo de retraso entre el final del flash de luz UV y el inicio de la primera vuelta pronunciada (calculado por *Chemotaxis*_{V1(beta)}).

A.5 La longitud de arco recorrida durante cada vuelta (U)

$U = \phi(b) - \phi(a) + 2\pi N_{IPmin}$, donde N_{IPmin} es el número de cruces por el punto mas cercano al centro del gradiente en el intervalo $Turn$ y a, b , indican el inicio y el final de cada vuelta pronunciada (Fig. 3.1).

A.6 El tiempo de retraso entre el final del flash de luz UV y el inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ (τ_{F0}) o a la primera vuelta pronunciada (τ_{T0})

$$\tau_{F0} = a_1 - a_0 ; \quad \tau_{T0} = a_1 - a_0 ,$$

donde a_0 indica el tiempo al final del flash UV y a_1 indica el tiempo al inicio de la primera fluctuación en la $[Ca^{2+}]_i$ o al inicio de la primera vuelta pronunciada (Fig. 3.1).

A.7 La velocidad angular durante las vueltas pronunciadas

$$w_T = v_T k_T ,$$

donde v_T y k_T son la velocidad y la curvatura de la trayectoria durante cada periodo de viraje.

Apéndice B

Artículos

B.1 Artículos publicados en revistas internacionales

1. Espinal J.[§], Aldana M.[§], Guerrero A.[§], Wood C.D., Darszon A., Martínez-Mekler G. **Discrete Dynamics Model for the Ca^{2+} Signaling Network Related to Sperm Navigation.** *Plos One*, 2011; **6**(8):e22619.

Understanding how spermatozoa approach the egg is a central biological issue. Recently a considerable amount of experimental evidence has accumulated on the relation between oscillations in $[Ca^{2+}]_i$ in the sea urchin sperm flagellum, triggered by peptides secreted from the egg, and sperm motility. Determination of the structure and dynamics of the signaling pathway leading to these oscillations is a fundamental problem. However, a biochemically based formulation for the comprehension of the molecular mechanisms operating in the axoneme as a response to external stimulus is still lacking. Based on experiments on the *S. purpuratus* sea urchin spermatozoa, we propose a signaling network model where nodes are discrete variables corresponding to the pathway elements and the signal transmission takes place at discrete time intervals according to logical rules. The validity of this model is corroborated by reproducing previous empirically determined signaling features. Prompted by the model predictions we performed experiments which identified novel characteristics of the signaling pathway. We uncovered the role of a high voltage-activated Ca^{2+} channel as a regulator of the delay in the onset of oscillations after activation of the signaling cascade. This delay time has recently been shown to be an important regulatory factor for sea urchin sperm reorientation. Another finding is the participation of a voltage-dependent calcium-activated K^+ channel in the determination of the period of the $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations. Furthermore, by analyzing the spread of network perturbations we find that it operates in a dynamically critical regime. Our work demonstrates that a coarse-grained approach to the dynamics of the signaling pathway is capable of revealing regulatory sperm navigation elements and provides insight, in terms of criticality, on the concurrence of the high robustness and adaptability that the reproduction processes are predicted to have developed throughout evolution.

[§]These authors contributed equally to this work.

- Guerrero A., Carneiro J., Pimentel A., Wood C.D., Corkidi G., Darszon A. **Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions.** *MHR*. 2011; **17(8)**:511-23.

The spermatozoon must find its female gamete partner and deliver its genetic material to generate a new individual. This requires that the spermatozoon be motile and endowed with sophisticated swimming strategies to locate the oocyte. A common strategy is chemotaxis, in which spermatozoa detect and follow a gradient of chemical signals released by the egg and its associated structures. Decoding the female gamete's positional information is a process that spermatozoa undergo in a three dimensional space (3D), however due to their speed and small size, this process has been studied almost exclusively in spermatozoa restricted to swimming in two dimensions (2D). This review examines the relationship between the mechanics of sperm propulsion and the physiological function of these cells in 3D. It also considers whether it is possible to derive all the 3D sperm swimming characteristics by extrapolating from 2D measurements. It is concluded that full insight into flagellar beat dynamics, swimming paths and chemotaxis under physiological conditions will eventually require quantitative imaging of flagellar form, ion flux changes, cell trajectories and modelling of free-swimming spermatozoa in 3D.

- Guerrero A., Wood C.D., Nishigaki T., Carneiro J., Darszon A. **Tuning sperm chemotaxis.** *Biochem Soc Trans*. 2010; **38(5)**:1270-4.

Sperm chemotaxis is a long-term puzzle and most of our knowledge comes from studying marine animals that are external fertilizers. Sperm are attracted by diffusible chemical factors (chemoattractants) released from the egg which redirect their swimming paths towards their source. This redirection is driven by increases in flagellar curvature that correlate with transient flagellar Ca^{2+} increases. Recent experimental and modelling results provide insights into the signal flow underlying the translation of an external chemical gradient into an intracellular molecular and motor response. A fundamental element of sea-urchin sperm chemotaxis lies in the ability of these cells to suppress Ca^{2+} -mediated increases in flagellar curvature while experiencing an increasing chemoattractant gradient. The article considers this new evidence and summarizes the known underlying cellular mechanisms and behavioural strategies that sperm use to locate and fertilize the oocyte.

- Guerrero A., Nishigaki T., Carneiro J., Yoshiro T., Wood C.D., Darszon A. **Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing.** *Dev Biol*. 2010; plus **344**:52-65.

Marine invertebrate oocytes establish chemoattractant gradients that guide spermatozoa towards their source. In sea urchin spermatozoa, this relocation requires coordinated motility changes initiated by Ca^{2+} -driven alterations in sperm flagellar curvature. We discovered that *Lytechinus pictus* spermatozoa undergo chemotaxis in response to speract, an egg-derived decapeptide previously noted to stimulate non-chemotactic motility alterations in *Strongylocentrotus purpuratus* spermatozoa. Sperm of both species responded to speract gradients with a sequence of turning episodes that correlate with transient flagellar Ca^{2+} increases, yet only *L. pictus* spermatozoa accumulated at the gradient source. Detailed analysis of sperm behavior revealed that *L. pictus* spermatozoa selectively undergo Ca^{2+} fluctuations while swimming along negative speract gradients while *S. purpuratus* sperm generate Ca^{2+} fluctuations in a spatially non-selective manner. This difference is attributed to the selective suppression of Ca^{2+} fluctuations of *L. pictus* spermatozoa as they swim towards the source of the chemoattractant gradient. This is the first study to compare and characterize the motility components that differ in chemotactic and non-chemotactic spermatozoa. Tuning of Ca^{2+} fluctuations and associated turning episodes to the chemoattractant gradient polarity is a central feature of sea urchin sperm chemotaxis and may be a feature of sperm chemotaxis in general.

B.2 Artículos en revisión

1. Servin-Vences R, Tatsu Y, Hisanori A, Guerrero A, Yumoto N, Darszon A, Nishigaki T. **Effects of progesterone on human sperm intracellular Ca^{2+} concentration and the flagellar bend form studied by its caged analog.**

Progesterone is a physiological agonist for mammalian sperm, modulating its flagellar movement and facilitating the acrosome reaction. To study the initial action of progesterone, we developed a caged analog with a photosensitive group: nitrophenyl-ethanediol, at position 20. Using this compound, we performed Ca^{2+} imaging of human spermatozoa with stroboscopic illumination and analyzed the effects of progesterone on the $[Ca^{2+}]_i$ of beating flagella for the first time. We observed a transient $[Ca^{2+}]_i$ increase in the head and the flagellum upon photolysis of the caged progesterone and an increase in flagellar curvature particularly in the distal region. Detailed kinetic analysis revealed that progesterone elicits an increase in the $[Ca^{2+}]_i$ almost simultaneously in the head and the flagellum, rather than a Ca^{2+} wave from the base of the head as reported in mouse sperm, indicating differences in the signaling pathways of progesterone in these two mammalian sperm species. Our observation is consistent to the recent discovery, that is, progesterone activates CatSper channel in human sperm, but not in mouse sperm.

B.3 Artículos en preparación

1. Guerrero A, Espinal J, Wood CD, Rendón J, Carneiro J, Martínez-Mekler G, Darszon A. **Alterations of the Ca^{2+} permeability changes triggered by chemoattractants disorient marine spermatozoa.**

In many broadcast-spawning marine organisms, oocytes release chemical gradients that attract homologous spermatozoa through chemotaxis. In the sea urchin *Lytechinus pictus*, the chemoattractant peptide speract triggers a train of fluctuations of intracellular Ca^{2+} concentration in the sperm flagella. Each transient increase leads to a momentary increase in flagellar asymmetry, known as a chemotactic turn. Furthermore, chemotaxis requires a precise spatiotemporal coordination between the Ca^{2+} -dependent turns and the form of chemoattractant gradient. Spermatozoa that limit the generation of Ca^{2+} -dependent turns while swimming down the chemoattractant gradient, and conversely suppress turning events while swimming up gradient, successfully approach the center of the gradient. In this work, we show that niflumic acid (*NFA*), an inhibitor of Ca^{2+} -activated channels (*CaCC*), disrupts chemotactic responses of *L. pictus* spermatozoa. We present a novel automated method for analysing sperm behaviour, which shows that *NFA* does not alter the spatiotemporal coordination that biases the initiation of Ca^{2+} -dependent turns towards negative chemoattractant gradients. Instead, *NFA* treatment of spermatozoa disrupts chemotaxis through altering the arc length travelled during each chemotactic turning event. This alteration to the trajectory of the chemotactic turn has the effect of disorientating the spermatozoa at the termination of the turning event. A discrete mathematical model of the signalling pathway suggests that *NFA* modifies the speract-triggered ion permeability changes through the concerted inhibitory effect upon the plasma membrane channels *HCN*, *CaCC* and *CaCK*.