



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EL SPERACT, UN PÉPTIDO QUE REGULA LA MOVILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR, ALTERA SU METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JUAN GARCÍA RINCÓN

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo Chávez Cosío – Instituto de Cardiología, Ignacio Chávez, México.

Dr. Arturo Hernández Cruz – Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Cuernavaca Morelos, Marzo, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, en el grupo del Dr. Alberto Darszon del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Reconocimiento

Al apoyo económico recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de una beca de Doctorado (172443), al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA: IN202312 a AD y IN204112 a CB) a través de una beca de Doctorado. Agradezco infinitamente la ayuda altruista de la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, durante la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado

Dr. Adán Oswaldo Guerreo Cárdenas – Instituto de Biotecnología - UNAM.

Dr. Antonio Peña Díaz – Instituto de Fisiología celular - UNAM.

Dra. Esmeralda Rodríguez Miranda – Universidad de Guanajuato.

Dr. Gustavo Pedraza Alva – Instituto de Biotecnología - UNAM.

Dra. Rosario Vera Estrella – Instituto de Biotecnología - UNAM.

Dedicatoria

Con cariño:
Para mi Creador.

Con Amor a mi Familia:
Alejandrina Barcenás y Juan Manuel García Barcenás.

A mis padres y hermanas:
Anselma Rincón y Pablo García; Ma. Teresa y Ma. de la Luz.

Gracias!.

Agradecimientos

A la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, por enseñarme la virtud del trabajo.

Al Dr. Alberto Darszon Israel, por enseñarme la virtud de la disciplina.

A mis amigos: Margarito Herrera, Ángel Romero, Víctor Ríos y José L. de la Vega.

A mis compañeros de trabajo:

Doctores: T. Nishigaki; C. L. Treviño; G. J. Orta; J. C. Chávez; C. Sánchez; D. Figueiras; I. López.

Estudiantes: P. Martínez; Y. Sánchez; Omar J.; E. Mata; P. Torres; A. A. Sánchez; V. Loyo; C. Santana; A.L. González; O. Sánchez; F. Romero.

“Trabaja cada día, como si fuera el primero”

Anónimo.

ÍNDICE GENERAL

TEMA	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLA.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	
2.1. El erizo de mar.....	2
2.2. La fecundación.....	2
2.3. El espermatozoide de erizo de mar.....	2
2.4a. La movilidad del espermatozoide de erizo de mar.....	3
2.4a1. La movilidad del espermatozoide depende de la adenosina trifosfato intracelular.....	4
2.4a2. Los péptidos activadores de la movilidad inducen quiomiotaxis en el espermatozoide.....	4
2.5. La mitocondria.....	6
2.5a. El transporte de los ácidos grasos a la mitocondria.....	7
2.5b. La oxidación de los ácidos grasos.....	7
2.5c. La fosforilación oxidativa.....	7
2.5d. El Ca ²⁺ mitocondrial.....	9
III. ANTECEDENTES.....	10
IV. JUSTIFICACIÓN.....	12
V. HIPÓTESIS.....	12
VI. OBJETIVOS	
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1. Reactivos.....	13
7.2. Muestra biológica.....	13
7.3. Calibración del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides de erizo de mar permeabilizados con digitonina.....	14
7.3a. Permeabilización selectiva de los espermatozoides de erizo de mar con digitonina.....	14
7.3b. Calibración del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides permeabilizados.....	15
7.4. Distribución de la rodamina-123 en los espermatozoides intactos de erizo de mar.....	15
7.5. Determinaciones fluorométricas de potencial de membrana mitocondrial, de los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido y de pH intracelular en los espermatozoides intactos.....	16
7.6. Estadística.....	17

VIII. RESULTADOS	
8.1. La digitonina permeabiliza selectivamente la membrana plasmática de los espermatozoides de erizo de mar.....	18
8.2. Los espermatozoides permeabilizados con digitonina son viables.....	19
8.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides permeabilizados con digitonina.....	20
8.4. La rodamina-123 marca la mitocondria de los espermatozoides intactos de erizo de mar.....	23
8.5. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i>	25
8.6. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca^{2+}	26
8.7. El aumento artificial del pH intracelular despolariza la mitocondria de los espermatozoides.....	27
8.8. La despolarización de la mitocondria inducida por speract depende parcialmente de la actividad de la F_0F_1 -ATP sintasa.....	32
8.9. El speract despolariza la mitocondria cuando está parcialmente desacoplada con CCCP.....	33
8.10. La despolarización de la mitocondria inducida por speract involucra la actividad de la CPT-I.....	34
8.11. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido en el espermatozoide.....	35
8.12. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido mitocondrial debido a la oxidación de los ácidos grasos.....	37
IX. DISCUSIÓN.....	41
X. CONCLUSIÓN.....	46
XI. PERSPECTIVAS.....	48
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	49
XIII. APÉNDICE.....	55
13.1. Artículo de Doctorado:	
Juan García-Rincón , Alberto Darszon, Carmen Beltrán, Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. <i>BBA - Bioenergetics</i> (2016) 1857: 415-426.	

ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLA

FIGURA	PÁGINA
Fig. 1. El espermatozoide del erizo de mar.....	3
Fig. 2. Modelo propuesto de la vía de señalización al speract en el espermatozoide de erizo de mar.....	5
Fig. 3. El speract induce quimiotaxis en el espermatozoide de erizo de mar de las especies <i>L. pictus</i> y <i>S. purpuratus</i>	6
Fig. 4. Modelo propuesto del metabolismo energético en el espermatozoide de erizo de mar.....	8
Fig. 5. Mecanismo de acción de los inhibidores mitocondriales y de los ionóforos.....	11
Fig. 6. La digitonina aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i>	18
Fig. 7. Los espermatozoides permeabilizados con digitonina son viables.....	19
Fig. 8. La antimicina y el cianuro de potasio despolarizan la mitocondria de los espermatozoides permeabilizados.....	20
Fig. 9. Calibración del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides permeabilizados.....	22
Fig. 10. La rodamina-123 marca la mitocondria de los espermatozoides intactos de <i>S. purpuratus</i>	24
Fig. 11. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> ...	26
Fig. 12. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca^{2+}	27
Fig. 13. El speract aumenta el pH intracelular de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca^{2+}	28
Fig. 14. El aumento artificial de pH intracelular mediante la adición de NH_4Cl despolariza la mitocondria del espermatozoide, incluso en ausencia de Ca^{2+} externo.....	29
Fig. 15. La rotenona y el CCCP causan una acidificación aparente.....	30
Fig. 16. El CCCP y la rotenona acidifican la mitocondria del espermatozoide.....	31
Fig. 17. La despolarización de la mitocondria inducida por speract depende parcialmente de la actividad de la F_0F_1 -ATP sintasa.....	32
Fig. 18. La despolarización inducida por speract depende parcialmente del grado de desacoplamiento de la mitocondria.....	33
Fig. 19. El speract despolariza la mitocondria principalmente por la actividad de la CPT-I.	34
Fig. 20. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido....	36
Fig. 21. El aumento de nicotinamida adenina dinucleótido reducido mitocondrial inducido por speract depende de la actividad de la CPT-I.....	38
Fig. 22. El octanoato no altera el aumento de nicotinamida adenina dinucleótido reducido por speract.....	39
Fig. 23. El speract aumenta la nicotinamida adenina dinucleótido reducido independientemente de la lactato deshidrogenasa.....	40
Fig. 24. Modelo propuesto para la activación del metabolismo energético mitocondrial inducido por speract.....	47
Tabla 1. Determinación del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides permeabilizados.....	23

ABREVIATURAS

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$	Concentración de Ca^{2+} externo
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} intracelular
$[\text{K}^+]_{\text{ext}}$	Concentración de K^+ externo
AMA	Agua de mar artificial
AMA0Ca	Agua de mar artificial con calcio 100 nM
AMA1Ca	Agua de mar artificial con calcio 1 mM
ATP	Adenosina trifosfato
BCECF-AM	2,7,-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceina, acetoximetilester
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
CPT-I	Carnitina palmitoiltransferasa-I
CPT-II	Carnitina palmitoiltransferasa-II
CTE	Cadena transportadora de electrones
Em	Potencial de membrana plasmática
AGL	Ácidos grasos libres
AGL-CL	Ácidos grasos libres de cadena larga
LDH	Lactato deshidrogenasa
MI	Medio intracelular
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PC	Fosfatidilcolina
pH _i	pH intracelular
PLA2	Fosfolipasa A2
RA	Reacción acrosomal
rod-123	Rodamina-123
PAM	Péptidos activadores de la movilidad de espermatozoides
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana mitocondrial
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación

I. RESUMEN

El espermatozoide de erizo de mar tiene una mitocondria, que además de ser la fuente principal de energía en forma de ATP, puede modular los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) para regular su movilidad y posiblemente la reacción acrosomal (RA, evento de exocitosis indispensable para que el espermatozoide fecunde al óvulo homólogo). El speract es un decapeptido que difunde de la capa externa de gelatina del óvulo, que al unirse a su receptor en la membrana del flagelo del espermatozoide, entre otros cambios fisiológicos, estimula la movilidad y la respiración de dichas células. La alteración de la función mitocondrial con inhibidores específicos para este organelo, induce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que depende de la presencia de Ca^{2+} externo ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) (Ardón et al., 2009). Para comprender mejor la relación entre la función de la mitocondria y la respuesta al speract, evaluamos los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) y en los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) en los espermatozoides de erizo de mar de la especie *Strongylocentrotus purpuratus*. Nuestros resultados muestran que la estimulación de los espermatozoides con speract despolariza la mitocondria y aumenta los niveles de NADH. Además, resultados obtenidos con los inhibidores (etomoxir y perhexilina) de la carnitina palmitoiltransferasa-I (CPT-I), enzima esencial para el transporte de los ácidos grasos en la mitocondria, sugieren que lo anterior se debe a que el speract estimula el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria para su oxidación. Sorprendentemente, estas respuestas son independientes del Ca^{2+} y se deben al aumento de pH intracelular (pH_i) inducido por speract. Nuestros resultados indican que dicho aumento de pH_i coordina finamente la activación del metabolismo energético mitocondrial que regula la movilidad del espermatozoide necesaria para que éste llegue y fecunde al óvulo homólogo.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. El erizo de mar

El erizo de mar es un organismo deuterostomado (antecesor de los vertebrados), de fecundación externa, que produce cantidades enormes de gametos. De un erizo macho se obtienen $\sim 10^{10}$ espermatozoides y de una hembra $\sim 10^8$ óvulos, lo cual permite aislar los componentes membranales involucrados en el diálogo entre los gametos. El erizo de mar se ha utilizado como modelo de estudio de la fecundación por más de 150 años, y el uso de sus espermatozoides como modelo de estudio, ha permitido caracterizar los mecanismos generales de señalización involucrados en la fecundación, además de que en esta célula se descubrió la reacción acrosomal (RA; ver siguiente sección) (Rothschild, 1948; Hagström, 1956). Estas características hacen al erizo de mar un excelente modelo para estudiar los procesos fisiológicos involucrados en la fecundación.

2.2. La fecundación

La fecundación es un evento fundamental en la vida de los organismos que dependen de la reproducción sexual para la generación de nuevos individuos. El espermatozoide maduro es una célula especializada con la capacidad de buscar, reconocer y de fecundar al óvulo de manera especie-específica. Previo a la fecundación, el espermatozoide debe experimentar la RA, evento exocitótico que consiste en la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal. Durante este proceso fisiológico de exocitosis, se liberan las enzimas hidrolíticas contenidas en el granulo acrosomal que facilitan al espermatozoide atravesar la capa externa (de gelatina) del óvulo para fecundarlo (Hirohashi et al., 2008; Santella et al., 2012; Pomin, 2015).

2.3. El espermatozoide de erizo de mar

Morfológicamente el espermatozoide de erizo de mar es más sencillo que el de mamífero; básicamente está constituido por la cabeza y el flagelo. En la región de la cabeza se ubican organelos como el acrosoma, el núcleo, el cuerpo basal, la envoltura nuclear redundante y su única mitocondria (Fig. 1). La región del flagelo contiene al axonema que constituye el aparato motor del espermatozoide, compuesto por nueve pares de microtúbulos alrededor de un par central (9 + 2) conectados por las dineínas.

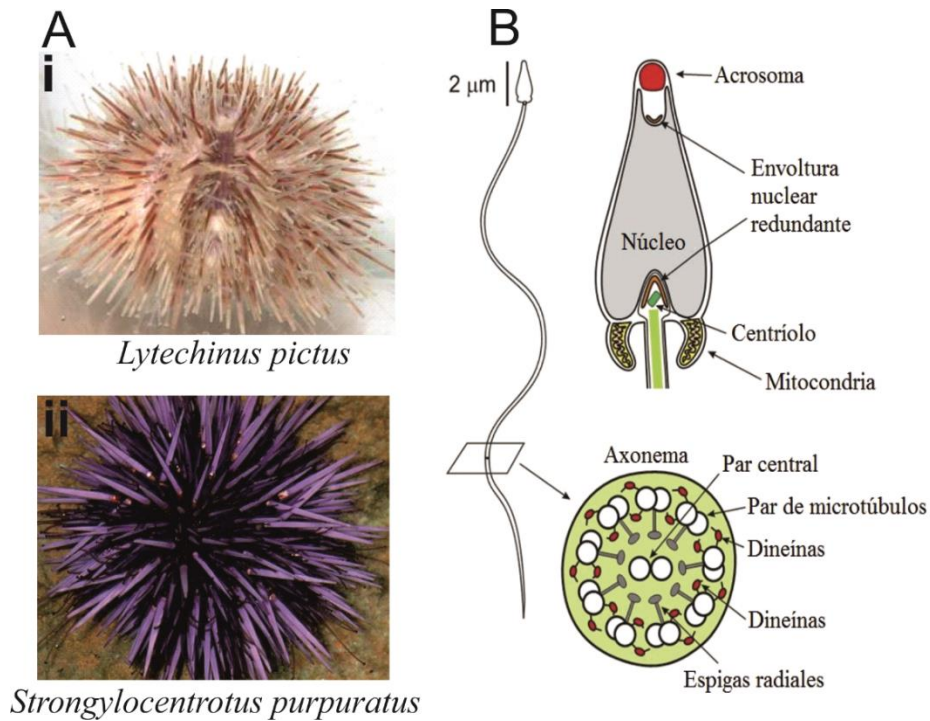


Fig. 1. El espermatozoide del erizo de mar. (A) Erizos de mar de la especie (i) *L. pictus* y (ii) *S. purpuratus*, (B) A la izquierda, esquema del espermatozoide de erizo de mar. Lado superior derecho, sección de la cabeza con los diferentes organelos que la integran; lado inferior derecho, sección transversal del flagelo compuesto principalmente por el axonema y las dineínas. Modificada de: Darszon et al., 2011.

2.4a. La movilidad del espermatozoide de erizo de mar

El erizo de mar almacena sus espermatozoides en las gónadas en un estado inmóvil debido a la alta tensión de CO_2 , que mantiene el pH_i ácido en el espermatozoide el cual inhibe fuertemente a las enzimas que se estimulan por pH alcalino. Las dineínas, son ATPasas (unidas al axonema que generan el batido flagelar), altamente dependientes de pH siendo inactivas a pH ácido. Cuando el erizo de mar libera sus espermatozoides inmóviles en el mar, se produce una salida rápida de H^+ que aumenta el pH_i del espermatozoide (Nishigaki et al., 2014). Las dineínas hidrolizan el ATP proveyendo la energía suficiente para desplazar los microtúbulos del axonema impulsando el nado del espermatozoide. Por tanto, dicha enzima es la principal consumidora de ATP, mientras que la mitocondria es la principal fuente de energía en forma de ATP (Christen et al., 1983): Esto sugiere que la movilidad y la respiración del espermatozoide están relacionadas y finamente reguladas por el pH_i (Christen et al., 1983; Nishigaki et al., 2014).

2.4a1. La movilidad del espermatozoide depende de la adenosina trifosfato intracelular

El pH_i menor a 7.0 mantiene a los espermatozoides en un estado inmóvil. Bajo esta condición, los niveles de ATP en el espermatozoide son altos, debido a que las dineínas están inhibidas (Christen et al., 1983). El aumento de pH_i de 7.0 a 7.4 estimula la actividad de las dineínas, que hidrolizan el ATP para impulsar el nado del espermatozoide (Christen et al., 1986). De manera paralela, la respiración del espermatozoide se estimula en respuesta a la demanda energética (Christen et al., 1983, 1986). En esta condición, la movilidad basal del espermatozoide alcanza un equilibrio dinámico con la respiración del mismo (Christen et al., 1986). No obstante, si el pH_i aumenta a más de 7.4, la actividad de las dineínas sobrepasa a la síntesis de ATP lo cual conduce a una inhibición gradual de la movilidad del espermatozoide (Christen et al., 1986), indicando que la función mitocondrial está involucrada en la regulación de la movilidad.

2.4a2. Los péptidos activadores de la movilidad inducen quimiotaxis en el espermatozoide

Los péptidos activadores de la movilidad de los espermatozoides (PAM) difunden de la capa de gelatina que rodea al óvulo formando un gradiente de concentración, son capaces de modular la movilidad del espermatozoide de manera especie-específica. El speract fue el primer PAM que se purificó e identificó estructuralmente de los óvulos de erizo de mar de la especie *S. purpuratus* (Hansbrough y Garbers, 1981). Cuando el speract se une a su receptor, que se encuentra en la membrana flagelar del espermatozoide, desencadena una serie de cambios fisiológicos que preparan al espermatozoide para localizar y fecundar al óvulo (Guerrero et al., 2010). La unión de speract a su receptor (Fig. 2) activa a la guanilato ciclasa (GC) e induce la síntesis de GMPc (Cardullo et al., 1994) que activa el canal Tetra-KCNG el cual deja salir K^+ al medio extracelular causando una hiperpolarización transitoria de la membrana plasmática. Esta hiperpolarización, facilita la salida de Ca^{2+} intracelular a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependiente de K^+ (NCKX), remueve la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Cav), estimula la actividad de la adenilato ciclasa y activa tanto al intercambiador Na^+/H^+ (NHE) como al canal de Na^+ SpHCN (Lee, 1985; Beltrán et al., 1996; Darszon et al., 2011). La estimulación del NHE aumenta la salida de H^+ conduciendo al aumento de pH_i (Lee, 1985). Este aumento de pH_i reduce la actividad de la GC, activa el canal de Ca^{2+} específico de espermatozoides (CatSper) y estimula tanto a la AC soluble (sAC) como a las dineínas (Beltrán et al., 2007; Darszon et al., 2008; Seifert et al., 2015). La activación de la AC eleva los niveles de AMPc (Beltrán et al., 2007), que modulan

la actividad de canales y de transportadores iónicos (Nishigaki et al., 2014). La hiperpolarización y/o el AMPc activan los canales SpHCN que permiten la entrada de Na⁺ causando la despolarización de la membrana plasmática. La entrada de Ca²⁺, ya sea través de CatSper o de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Cav) conducen al aumento de la [Ca²⁺]_i, el cual correlaciona con cambios en la trayectoria del espermatozoide (Darszon et al., 2008; Guerrero et al., 2011; Pichlo et al., 2014).

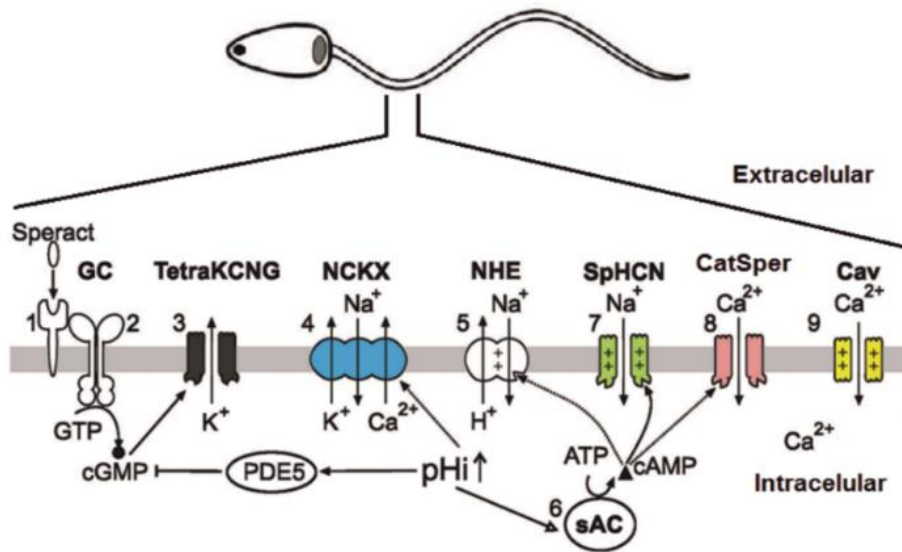


Fig. 2. Modelo propuesto de la vía de señalización al speract en el espermatozoide de erizo de mar. Entre otros cambios fisiológicos, (1) la unión del speract a su receptor induce (2) el aumento de GMPc, (3) la hiperpolarización de la membrana plasmática, (5) el aumento de pHi, y (7-9) aumentos en las concentraciones iónicas de Na⁺ y Ca²⁺. (2) GC, guanilato ciclasa; (3) TetraKCNG, canal de K⁺ regulado por GMPc; (4) NCKX, intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ dependiente de K⁺; (5) NHE, intercambiador de Na⁺/H⁺; (6) sAC, adenilato ciclasa soluble; (7) SpHCN, canal de Na⁺ activado por hiperpolarización y por AMPc; (8) CatSper, canal de Ca²⁺ específico de espermatozoides regulado por AMPc y/o pHi; (9) Cav, canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje (Modificada de: Darszon et al., 2008).

El espermatozoide de erizo de mar cuenta con un sistema de navegación sofisticado, capaz de detectar concentraciones picomolares del quimioatrayente. Las señales químicas como los PAM, son liberadas por las células accesorias del óvulo formando un gradiente de concentración, que estimulan y re-dirigen el nado del espermatozoide hacia el óvulo. A este mecanismo se le llama quimiotaxis. Los PAM mejor caracterizados en la respuesta quimiotáctica son el speract y el resact en los espermatozoides de erizo de mar de las especies *L. pictus* (Guerrero et al., 2010) y *Arbacia punctulata* (Pichlo et al., 2014), respectivamente. Dichos PAM inducen aumentos en la [Ca²⁺]_i que dependen de la presencia de Ca²⁺ externo. La entrada de Ca²⁺ ocurre principalmente a través del

canal de Ca^{2+} CatSper que se expresa exclusivamente en el gameto masculino, siendo indispensable en los procesos de fertilidad de los mamíferos (Xia et al., 2007; Smith et al., 2013). De manera similar, en el espermatozoide de erizo de mar de *A. punctulata* y de *S. purpuratus*, el CatSper se distribuye en la membrana flagelar (Seifert et al., 2015; Beltrán, datos no publicados), y su apertura permite la entrada de Ca^{2+} al citoplasma que se propaga del flagelo hacia la cabeza (Wood et al., 2003; Xia et al., 2007; Darszon et al., 2011; Seifert et al., 2015). Este aumento de Ca^{2+} se compone de varias oscilaciones, y cada pico de dicha oscilación correlaciona con un cambio de trayectoria en el nado del espermatozoide (Guerrero et al., 2010). La secuencia orquestada de cada oscilación de Ca^{2+} regula la vuelta pronunciada seguida del nado recto re-dirigiendo el nado del espermatozoide hacia la fuente del quimioatrayente (Fig. 3) (Darszon et al., 2008; Guerrero et al., 2010; Alvarez et al., 2012)

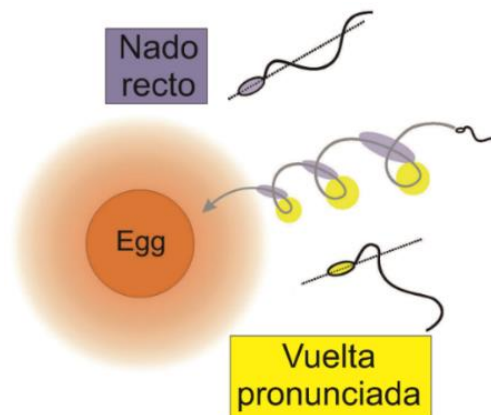


Fig. 3. El speract induce quimiotaxis en el espermatozoide de erizo de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus*. El speract difunde del óvulo formando un gradiente de concentración, que el espermatozoide detecta produciéndose oscilaciones de Ca^{2+} en el flagelo, las cuales coordinan finamente la secuencia de la vuelta pronunciada (en amarillo) seguido del nado recto (en morado) orientando su nado hacia el óvulo (Modificada de: Darszon et al., 2008).

2.5. La mitocondria

El espermatozoide de erizo mar tiene una sola mitocondria situada en la base de la cabeza (Longo y Anderson, 1968), constituida por una membrana externa (MME) y una interna (MMI), que delimitan el espacio intermembranal de la matriz mitocondrial. La matriz mitocondrial, entre otras moléculas, contiene a las enzimas que participan en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación (Ernster y Schatz, 1981; Glancy y Balaban, 2012). La MMI, impermeable a los protones (H^+) contiene a los cuatro complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) y a la F_0F_1 -ATP sintasa (Mazat et al., 2013), mientras que la MME es altamente permeable debido que contiene acuaporinas,

proteínas integrales de membrana que forman poros permitiendo el paso de moléculas hasta de 5000 Daltones.

2.5a. Transporte de los ácidos grasos a la mitocondria

Los ácidos grasos libres de cadena larga (AGL-CL), son transportados al interior de la mitocondria para su oxidación y la producción de energía (Eaton et al., 1996). El principal mecanismo de entrada de los AGL-CL es a través del sistema de transporte de las carnitinas (Eaton et al., 1996; Eaton, 2002) (Fig. 4). La acil-CoA sintasa es la primera enzima que participa en el transporte de los AGL-CL y está localizada en la MME (Lopaschuk et al., 1994). Esta enzima, esterifica el AGL-CL con la CoA para formar el acil-CoA (AGL-CL activado). La carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I), sensible a pH_i (Bezaire et al., 2004), se localiza en la cara interna de la MME y cataliza la formación de acil-carnitina a partir del acil-CoA (Lopaschuk et al., 1994). La CPT-I es considerada un punto de regulación para la translocación del acil-CoA al interior de la mitocondria. La acil carnitina translocasa transporta la acil-carnitina a través de la MMI. La CPT-II que está asociada a la cara interna de la MMI, realiza la reacción inversa de la CPT-I regenerando la acil-CoA en la matriz mitocondrial para alimentar a la β -oxidación (Lopaschuk et al., 1994).

2.5b. La oxidación de los ácidos grasos

La β -oxidación consiste en la remoción secuencial de dos átomos de carbono a partir del extremo carboxilo del AGL (Eaton et al., 1996). Esta vía se compone básicamente de cuatro reacciones, primero una deshidrogenación de la acil-CoA. Los electrones removidos de esta molécula se transfieren al FAD para formar el FADH_2 (estado reducido). La segunda y la tercera reacción son una hidratación y una deshidrogenación, respectivamente. En esta última reacción, el NAD^+ es el aceptor de los electrones. Finalmente, la escisión de la (ceto)acil-CoA libera a la acetil-CoA que se puede incorporar al ciclo de Krebs y continuar su oxidación hasta CO_2 (Eaton et al., 1996; Nelson y Cox, 2005).

2.5c. La fosforilación oxidativa

La energía producida por la oxidación de moléculas orgánicas, se conserva en los donadores de H^+ NADH y FADH_2 , que ceden sus electrones a la cadena transportadora de electrones (CTE) (Glancy y Balaban, 2012). La CTE está organizada en una serie de complejos (I-IV) proteicos

multiheteroméricos que pueden aceptar y donar electrones (Fig. 4). Los complejos I y II son los aceptores de electrones provenientes de NADH y de FADH_2 , respectivamente, transfiriéndolos a la ubiquinona, que a su vez los cede al complejo III. Este complejo cataliza la transferencia de los electrones al complejo IV el cual los cede al oxígeno molecular (O_2) que consume dos H^+ para la formación de una molécula de H_2O . A este proceso fisiológico se le conoce como respiración celular (Saraste, 1999). El paso de los electrones a través de los complejos I, III y IV están acoplados con la salida de H^+ hacia el espacio intermembranal. Los H^+ expulsados al espacio intermembranal generan un gradiente electroquímico de H^+ ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), que está compuesto por los gradientes de pH (ΔpH) y de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) (Nicholls, 1974).

El $\Delta\Psi$ es un parámetro clave en la fisiología mitocondrial, pues además de regular la síntesis de ATP también participa activamente en los procesos de fusión mitocondrial, en el importe de proteínas, en la generación de calor y en el intercambio de metabolitos y de iones con el citoplasma (Koopman et al., 2013). En condiciones de reposo el $\Delta\Psi$ es altamente electronegativo en el interior de -180 mV, y es el principal componente que impulsa a la F_0F_1 -ATP sintasa para la síntesis de ATP (Quarato et al., 2011). La estimulación de dicha enzima conduce a la disminución del $\Delta\Psi$ mientras que su inhibición lo aumenta (Nicholls, 1974; Quarato et al., 2011).

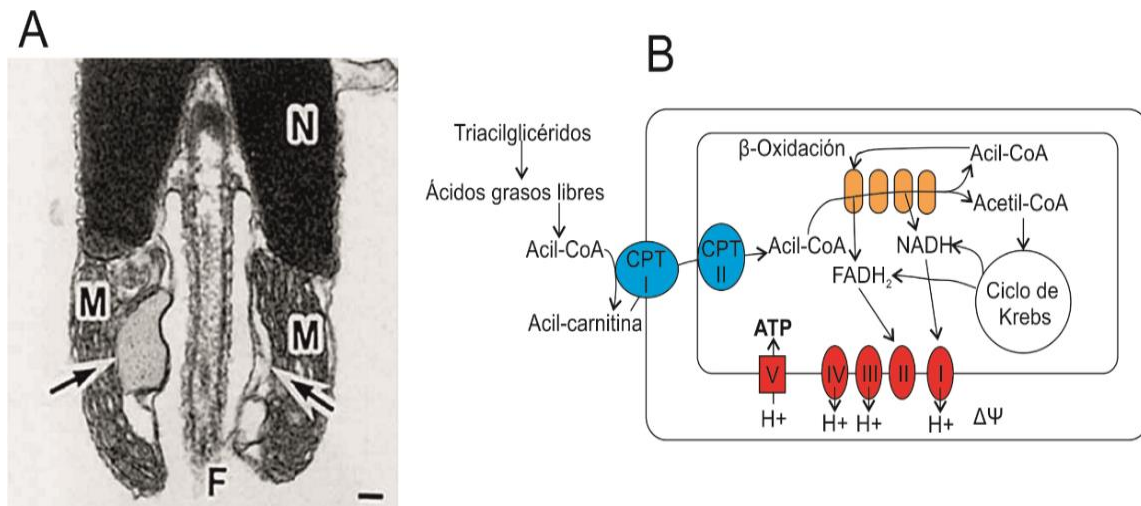


Fig. 4. Modelo propuesto del metabolismo energético en el espermatozoide de erizo de mar. (A) Microfotografía electrónica del espermatozoide de erizo de mar. Las dos flechas indican la distribución de las gotas lipídicas, ubicadas en el espacio intermembranal de la mitocondria. La barra negra indica la escala de 0.1 μm (Tomada de: Mita y Nakamura, 1998). (B) La oxidación de los lípidos endógenos se realiza en la mitocondria. Los triacilglicéridos son hidrolizados por la lipasa para formar los ácidos grasos libres de cadena larga, los cuales son transportados al interior

de la mitocondria mediante el sistema de las carnitinas (círculos azules). La β -oxidación de los ácidos grasos comprende 4 reacciones secuenciales (ver sección 2.5b, re presentadas en óvalos naranjas) las cuales producen FADH_2 , NADH y acetyl-CoA. Esta última se incorpora y se oxida en el ciclo de Krebs elevando los niveles de FADH_2 y NADH . Ambas moléculas ceden sus electrones a la CTE (óvalo rojo), que bombea H^+ al espacio intermembranal generando el $\Delta\Psi$ necesario para la síntesis de ATP por la ATPsintasa (complejo V). M, mitocondria; N, núcleo; F, flagelo; CPT, carnitina palmitoiltransferasa; I-IV, complejos de la CTE; V, F_0F_1 -ATPsintasa; $\Delta\Psi$, potencial de membrana mitocondrial.

2.5d. El Ca^{2+} mitocondrial

El $\Delta\Psi$ regula la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (De Stefani et al., 2011). Dicho ion entra en la matriz a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) sensible al $\Delta\Psi$ (Kirichok et al., 2004). El aumento de Ca^{2+} mitocondrial estimula la F_0F_1 -ATPsintasa y las deshidrogenas intra-mitocondriales sensibles a Ca^{2+} (Territo et al., 2000; Denton, 2009), para satisfacer los requerimientos energéticos de la célula. Además, la mitocondria puede liberar el Ca^{2+} al citoplasma a través del intercambiador electrogénico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) (Palty et al., 2010). Los flujos del Ca^{2+} de este organelo junto con los del retículo endoplásmico contribuyen a la propagación y a la sincronización de las señales de Ca^{2+} citoplasmático en diferentes tipos celulares (Szabadkai y Duchon, 2008; Jiang et al., 2013; Takeuchi et al., 2013). En los espermatozoides, las señales de Ca^{2+} intracelular modulan la movilidad, la quimiotaxis y la reacción acrosomal, eventos esenciales para que dicha célula fecunde exitosamente al óvulo homólogo (Darszon et al., 2011).

III. ANTECEDENTES

La única mitocondria del espermatozoide de erizo de mar localizada en la base de la cabeza, es importante para su movilidad (Mita y Nakamura, 1998) y posiblemente para la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ (Ardón et al., 2009) y la reacción acrosomal. Se sabe que el espermatozoide de erizo de mar obtiene su energía a través de la oxidación de lípidos endógenos (Hansbrough et al., 1980; Mita y Ueta, 1990). Los AGL-CL generados por la hidrólisis de los triacilglicéridos se incorporan del citoplasma al interior de la mitocondria a través del sistema de transporte de las carnitinas (sección 2.5a). La oxidación de los ácidos grasos produce el NADH y el FADH₂ (Eaton et al., 1996), los cuales ceden sus electrones a la CTE. Los H⁺ expulsados a través de la CTE establecen un $\Delta\Psi$ (Saraste, 1999), que es utilizado por la F₀F₁-ATP sintasa para la síntesis de ATP (Quarato et al., 2011). Las dineínas ubicadas en el axonema hidrolizan este ATP para sostener el nado del espermatozoide (Christen et al., 1983), estableciendo un equilibrio dinámico entre la síntesis de ATP mitocondrial con los componentes que hidrolizan el ATP.

Los PAM como el speract cuya unión a su receptor, induce en el espermatozoide entre otros efectos fisiológicos, un aumento en el pH_i, en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la respiración mitocondrial (Rodríguez y Darszon, 2003; Schackmann y Chock, 1986). Además, la alteración de la función mitocondrial con diferentes inhibidores mitocondriales (CCCP, desacoplante mitocondrial; antimicina, inhibidor del complejo III de la CTE; oligomicina, inhibidor de la F₀F₁-ATP sintasa y CGP37157, inhibidor del intercambiador Na⁺/Ca²⁺; Fig. 5), producen un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que depende de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ ($[Ca^{2+}]_{ext}$) (Ardón et al., 2009). Lo anterior indica que la mitocondria influye en la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ del espermatozoide. En este trabajo, quisimos saber si la mitocondria participa en la respuesta de los espermatozoides a speract.

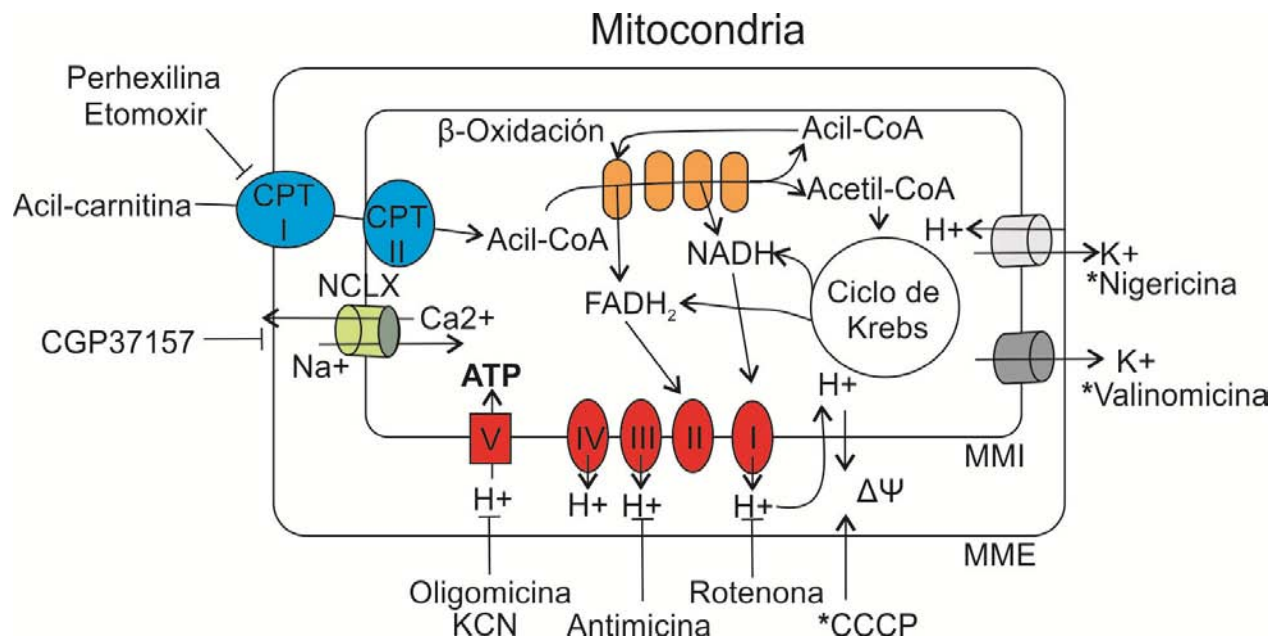


Fig. 5. Mecanismo de acción de los inhibidores mitocondriales y de los ionóforos. Los ionóforos están marcados con (*). NCLX, intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial; MMI, membrana mitocondrial interna; MME, membrana mitocondrial externa.

IV. JUSTIFICACIÓN

La única mitocondria del espermatozoide de erizo de mar, provee la energía suficiente para impulsar el nado de la célula. Y aunque la estimulación del espermatozoide con speract o con los inhibidores mitocondriales alteren la respiración mitocondrial y la homeostasis de Ca^{2+}_i , se desconoce la participación de la mitocondria en la vía de señalización del speract en el espermatozoide de erizo de mar.

V. HIPÓTESIS

La mitocondria participa en la vía de señalización del speract.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la mitocondria en la respuesta a speract de los espermatozoides de erizo de mar.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Encontrar la concentración de la rodamina-123 que marque a la mitocondria del espermatozoide de erizo de mar específicamente.
2. Caracterizar los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) inducidos por speract.
3. Investigar si el speract altera los niveles de NADH.
5. Evaluar la participación de la CPT-I sobre el $\Delta\Psi$ y en el aumento en los niveles de NADH inducidos por speract.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Reactivos

La digitonina, la antimicina A, la oligomicina, la rotenona, la valinomicina, el CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), la nigericina, la perhexilina, el etomoxir, el ácido cinámico, el gospol, el octanoato de sodio y el NH_4Cl se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA.). El cianuro de potasio y el CGP-37157 (7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-one) se obtuvieron de J.T. Baker (Edo. México, México) y de Calbiochem (Edo. México, México), respectivamente. El Hoechst (No. 33258), la rodamina-123 (rod-123) y el BCECF-AM fueron de Life Technologies (México, D.F.). El octanoato de sodio, la digitonina, el NH_4Cl , el KCN y el etomoxir se disolvieron en agua destilada, y el resto de los reactivos en dimetilsulfóxido (DM). Todos los stocks se almacenaron en alícuotas de 50 μl a -20°C hasta su uso.

El medio intracelular (MI) (modificado de: Castellano et al., 1995) contiene (en mM): manitol 750, KCl 0.1, NaCl 30, MgCl_2 5, EGTA 1, HEPES 40, Succinato 5 a pH 7.2.

El agua de mar artificial (AMA) contiene (en mM): NaCl 485, KCl 10, CaCl_2 10, MgCl 26, MgSO_4 30, NaHCO_3 2.5, Hepes 10, EDTA 0.1 a pH 7.8. El AMA1Ca es AMA pH 7.0 que contiene CaCl_2 1 mM y el AMA0Ca es AMA carente de CaCl_2 conteniendo EGTA 30 μM (pH 7.8), lo cual deja una concentración final de Ca^{2+} de 110 nM. La osmolaridad de las AMA's se determinó con el osmómetro VAPRO[®] modelo 5520, como lo indica el manual. En todos los casos la osmolaridad fue de 950-1000 mOsm.

7.2. Muestra biológica

Utilizamos los espermatozoides de erizo de mar de las especies *Strongylocentrotus purpuratus*, los cuales se obtuvieron de Pamanes S.A. de C.V. BC, México. Los espermatozoides de erizo de mar los obtuvimos inyectando 0.5 a 1 ml de KCl 0.5 M en la región intracelómica y los almacenamos “secos” a 4°C , máximo 12 h antes de iniciar el experimento.

7.3. Calibración del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides de erizo de mar permeabilizados con digitonina

7.3a. Permeabilización selectiva de los espermatozoides de erizo de mar con digitonina

Los indicadores fluorescentes del $\Delta\Psi$ se distribuyen en la matriz mitocondrial y en el medio extracelular, ya sea en mitocondrias aisladas o en las células eucariotas permeabilizadas selectivamente, facilitando las mediciones cuantitativas de $\Delta\Psi$ (Kuznetsov et al., 2008). Con la idea de determinar el $\Delta\Psi$ en el espermatozoide de erizo de mar, permeabilizamos las células con el detergente no iónico digitonina que remueve el colesterol de las membranas biológicas (Castellano et al., 1995). El grado de alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de erizo de mar tratados con digitonina se monitoreó con el indicador fluorescente hoechst (λ_{ex} 365, λ_{em} 470 nm (Castellano et al., 1995)). El hoechst es una molécula hidrofílica que difunde rápidamente al interior de las células permeabilizadas. La interacción del hoechst con las bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico localizado en el núcleo celular, produce cambios estructurales en el fluoróforo aumentando su fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia emitida por el hoechst indica el grado de la permeabilidad de la membrana plasmática ocasionada por la presencia de digitonina.

Los registros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro SLM 8000 Aminco™ con temperatura controlada a 14 °C y agitación constante. Se transfirieron 10 μl de espermatozoides (~10 millones) diluidos (1:10) en medio intracelular (MI) a una celda de vidrio conteniendo 0.8 ml de MI y 2 μM de Hoechst, y a los 20 s de iniciado el registro se adicionaron las diferentes concentraciones (0.002 - 0.2 mM) de digitonina.

La viabilidad celular de los espermatozoides permeabilizados con digitonina se evaluó de manera indirecta cuantificando la reacción acrosomal. Morfológicamente, los espermatozoides reaccionados se distinguen por la aparición del túbulo acrosomal en el ápice de la cabeza (Fig. 7A) Para ello, los espermatozoides diluidos (1:1000) en MI pH 7.8 suplementado con 5 μM de CaCl_2 conteniendo o no digitonina, se incubaron por 2 minutos a 14 °C. La reacción acrosomal de los espermatozoides se cuantificó observando las células en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100X.

7.3b. Calibración del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides permeabilizados

La rodamina-123 es una molécula lipofílica catiónica que se acumula en la mitocondria en función de su $\Delta\Psi$ que es altamente negativo (aproximadamente de -180 mV) (Schneckenburger et al., 2004). La pérdida del $\Delta\Psi$ resulta en la liberación de este fluoróforo de la mitocondria hacia el citoplasma disminuyendo su concentración en la matriz mitocondrial; como consecuencia la fluorescencia aumenta, lo cual indica una despolarización de la mitocondria (Foster et al., 2006; Zamzami et al., 2007).

Para calibrar el $\Delta\Psi$ en los espermatozoides de erizo de mar permeabilizados con digitonina, utilizamos la rodamina-123 (rod-123, λ_{ex} 497 y λ_{em} 523 nm (Emaus et al., 1986)). Diez μ l de los espermatozoides permeabilizados con digitonina, se transfirieron a una celda conteniendo 0.8 ml de MI, 30 nM de rod-123 y diferentes concentraciones de KCl (0.1 – 160 mM). Las células se incubaron 1 min a 14°C con agitación constante y a los 20 s de iniciado el registro se adicionaron diferentes concentraciones de antimicina (0.01 - 3 μ M) o de cianuro de potasio (KCN, 0.025 - 6 mM), inhibidores de los complejos III y IV de la CTE, respectivamente, o 1 μ M de oligomicina (inhibidor de la F_0F_1 -ATP sintasa). A los 60 segundos del mismo registro se agregó el ionóforo de K^+ valinomicina (2 μ M) para establecer un potencial de membrana en función de la $[K^+]$. Los valores de $\Delta\Psi$ se obtuvieron con la ecuación de Nernst (Baracca et al., 2003), que determina el potencial eléctrico que se establece en una membrana selectivamente permeable a un ion:

$$E = 2.3(RT/zF) \log([X]_o/[X]_i)$$

donde E es el potencial eléctrico de membrana (Voltios, V); R es la constante de los gases (8.314 J*Mol⁻¹*°K⁻¹); T, es la temperatura absoluta (287 °K); z, es la carga del ión; F, es la constante de Faraday (96,4867 J*Mol⁻¹*V⁻¹); $[X]_o$ y $[X]_i$, son las concentraciones externa e interna de K^+ , respectivamente.

7.4. Distribución de la rodamina-123 en los espermatozoides intactos de erizo de mar

El estado energético mitocondrial está directamente relacionado con la movilidad del espermatozoide de erizo de mar (Christen et al., 1983; Schackmann et al., 1984). El $\Delta\Psi$ de las

células intactas puede evaluarse cualitativamente con los indicadores fluorescentes sensibles a cambios de voltaje como la rodamina-123 (rod-123) (Schneckenburger et al., 2004). Para conocer la distribución de este fluoróforo en el espermatozoide del erizo de mar, incubamos las células diluidas (1:10) en AMA1Ca con diferentes concentraciones (5-20 μM) de rod-123 a 14 °C durante 3 h en la oscuridad. Los espermatozoides cargados con el fluoróforo se diluyeron 1:1000 en AMA y 10 μl de esta dilución se transfirieron a un portaobjetos, para observarse en un microscopio de epifluorescencia. La distribución del colorante en la célula completa se registró mediante microscopia confocal (confocal microscope Zeiss, LSM510).

7.5. Determinaciones fluorométricas de potencial de membrana mitocondrial, de los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido y de pH intracelular en los espermatozoides intactos

La fluorescencia de los espermatozoides se registró de acuerdo con lo reportado por Rodríguez y Darszon, (2003) y se describe a continuación. Los espermatozoides diluidos (1:10 en AMA1Ca) se incubaron a 14 °C durante 3 h en la oscuridad, en ausencia (para la determinación de NADH por autofluorescencia - λ_{ex} 350 y λ_{em} 460 nm- (Foster et al., 2006)) o en presencia de 10 μM de rod-123 (para la evaluación del Ψ - λ_{ex} 497 y λ_{em} 523 nm- (Emaus et al., 1986)) o de 0.5 μM de BCECF-AM (indicador de pH_i - λ_{ex} dual 438 y 500 nm; λ_{em} 550 nm- (Nishigaki et al., 2001)). El colorante libre se eliminó por centrifugación a 1000 $\times g$ durante 5 min a 4 °C, y el precipitado se resuspendió en el volumen original de AMA1Ca, excepto cuando las células se incubaron en ausencia de fluoróforo, que se diluyeron a 1/3 del volumen original de AMA1Ca. Para los registros fluorométricos se transfirieron 10 μl de espermatozoides a una celda redonda conteniendo 0.8 ml de AMA o AMA0Ca a 14 °C con agitación constante. A los 10 s de iniciado el registro se agregó el speract, el NH_4Cl , o los inhibidores de la mitocondria, de la CPT-I o de la lactato deshidrogenasa.

Como los nucleótidos de piridina son también indicadores del metabolismo energético mitocondrial, utilizamos su fluorescencia intrínseca para determinar los niveles de los mismos. Puesto que las propiedades espectroscópicas del NADH y del NAD(P)H son idénticas, los registros de autofluorescencia (λ_{ex} 360 y λ_{em} 450 nm) colectan la fluorescencia de ambos nucleótidos (Eng et al., 1989; Huang et al., 2002)). No obstante, en los espermatozoides de erizo de mar no hay glucólisis (Hansbrough et al., 1980; Rothschild, 1948) y su metabolismo es principalmente

oxidativo (Mita y Nakamura, 1998), por tanto la señal de la fluorescencia obtenida corresponde principalmente al NADH.

7.6. Estadística

Los registros de fluorescencia se adquirieron con el programa OLIS Globalworks 4.2 y los datos obtenidos de los registros se procesaron con Microsoft Excel, R project y Origin 6.0. Los datos de fluorescencia (F) se normalizaron con el promedio de la fluorescencia (F_0) antes de la adición de los agonistas o de los inhibidores y se expresan como $(F/F_0 - 1)$. Los valores de fluorescencia reportados son la media \pm ES (error estándar de la media). Para las evaluaciones estadísticas se utilizó la prueba t de Student o la ANOVA de una vía complementada con la prueba de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1. La digitonina permeabiliza selectivamente la membrana plasmática de los espermatozoides de erizo de mar

El $\Delta\Psi$ es uno de los parámetros que se utilizan para evaluar la integridad de la función mitocondrial (Kuznetsov et al., 2008). Para determinar el $\Delta\Psi$ en los espermatozoides de erizo de mar, permeabilizamos las células con digitonina que altera selectivamente la permeabilidad de las membranas biológicas debido a la presencia de colesterol, el cual está prácticamente ausente en la MMI (Colbeau et al., 1971). Debido a esta diferencia Castellano et al., (1995) lograron permeabilizar selectivamente la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar, dejándolo en condiciones en las que aún es capaz de llevar a cabo la reacción acrosomal. Para determinar el grado de alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de *S. purpuratus*, expusimos las células a diferentes concentraciones de digitonina (0.002 - 0.2 mM). La Fig. 6A, B muestra que concentraciones mayores a 0.03 mM de digitonina permeabilizan parcialmente la membrana plasmática del espermatozoide mientras que 0.25% de tritón X-100 la solubiliza completamente (Fig. 6, Tritón). Las concentraciones de 0.12 y 0.2 mM de digitonina, permeabilizaron completamente la membrana plasmática del espermatozoide. Debido a lo anterior, evaluamos la viabilidad de los espermatozoides permeabilizados, en presencia de las concentraciones de digitonina mencionadas.

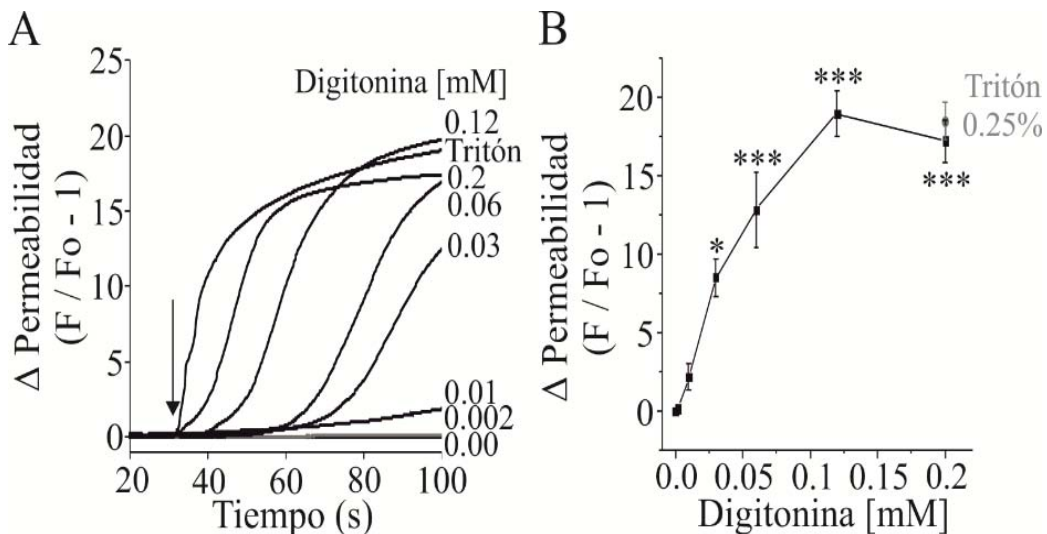


Fig. 6. La digitonina aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de *S. purpuratus*. (A) Trazos representativos del cambio de fluorescencia de los espermatozoides incubados con hoechst, tratados con diferentes concentraciones de digitonina (0.002 - 0.2 mM, indicado con la flecha). (B) Resumen estadístico de los experimentos realizados en A, evaluando el cambio de fluorescencia a los 50 s después de agregar las diferentes

concentraciones de digitonina. Las determinaciones se hicieron en una celda de vidrio conteniendo 10 millones de espermatozoides en 0.8 ml de MI y 2 μ M de hoechst. Los valores representan la media \pm ES, n = 3-4. *p < 0.05; ***p < 0.001.

8.2. Los espermatozoides permeabilizados con digitonina son viables

La RA que experimenta el espermatozoide previo a la fecundación del óvulo puede inducirse de manera natural o artificial. En el erizo de mar los inductores fisiológicos de la RA son: la envoltura (gelatina) del óvulo homólogo y el polímero de fucosa sulfatada (PFS, Hirohashi et al., 2008). En este modelo la RA también se puede inducir artificialmente en presencia de Ca^{2+} ya sea aumentando el pH_i a 9.0 o mediante ionóforos de Ca^{2+} como el A23187 (Wright et al., 1986). Para evaluar la viabilidad celular de los espermatozoides permeabilizados con digitonina, contabilizamos aquellos que experimentaron la RA de forma artificial, como reportaron Castellano et al., (1995). La Fig. 7A muestra la morfología de los espermatozoides reaccionados, los cuales se distinguen por presentar el túbulo acrosomal (lado izquierdo). Como se esperaba, la Fig. 7B muestra que el 95% de los espermatozoides permeabilizados con digitonina experimentaron la RA inducida artificialmente, indicando que son viables, de acuerdo con lo reportado (Castellano et al., 1995). Con base en lo anterior, seleccionamos la concentración de 0.12 mM de digitonina para permeabilizar la membrana plasmática de los espermatozoides que utilizamos para determinar el $\Delta\Psi$.

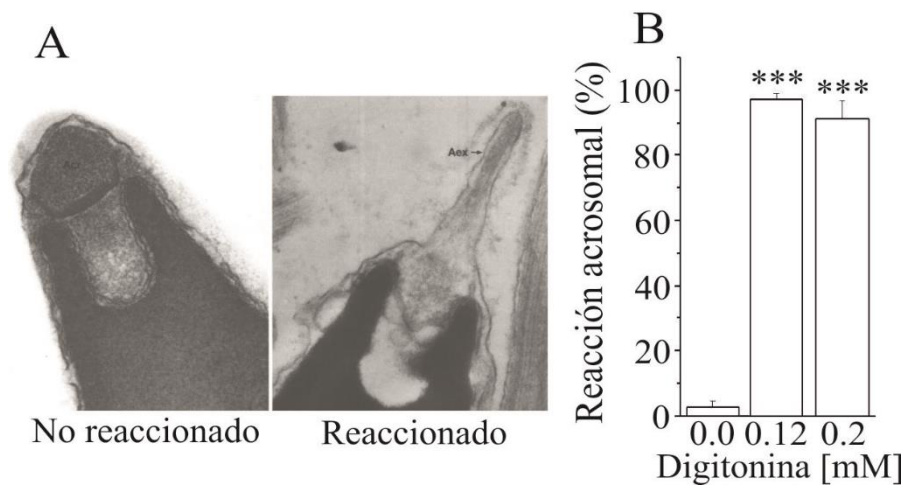


Fig. 7. Los espermatozoides permeabilizados con digitonina son viables. (A) Microfografía electrónica que contrasta la morfología de un espermatozoide reaccionado (a la derecha) de uno que no lo está (a la izquierda). La flecha indica la presencia del túbulo acrosomal. Tomada de: Castellano et al., 1995. (B) Resumen estadístico de los espermatozoides que experimentaron la reacción acrosomal. Para ello, los espermatozoides de erizo de mar diluidos (1:1000) en MI a pH 7.8 suplementado con $CaCl_2$ 5 μ M conteniendo o no digitonina. Las barras representan la media \pm ES, n = 3.

8.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides permeabilizados con digitonina

Se sabe que en las mitocondrias aisladas o en células permeabilizadas, el $\Delta\Psi$ mantiene una relación directa con el gradiente de K^+ (Di Lisa et al., 1995; Schackmann et al., 1984). Para determinar el $\Delta\Psi$ de los espermatozoides permeabilizados con digitonina, expusimos las células con el indicador de Ψ , rod-123, que a concentraciones menores de 100 nM relaciona de manera lineal la intensidad de la fluorescencia de rod-123 con la concentración externa de KCl (Baracca et al., 2003). Inicialmente, inhibimos la actividad del complejo III (con antimicina A) o IV (con KCN) de la CTE en los espermatozoides permeabilizados y cargados con 30 nM de rod-123. La Fig. 8A, B muestra que la antimicina despolariza la mitocondria de una manera que depende de su concentración, y que esta respuesta se satura con 1 μ M. Resultados similares se obtuvieron con KCN (Fig. 8C, D), cuya respuesta se satura con 1 mM.

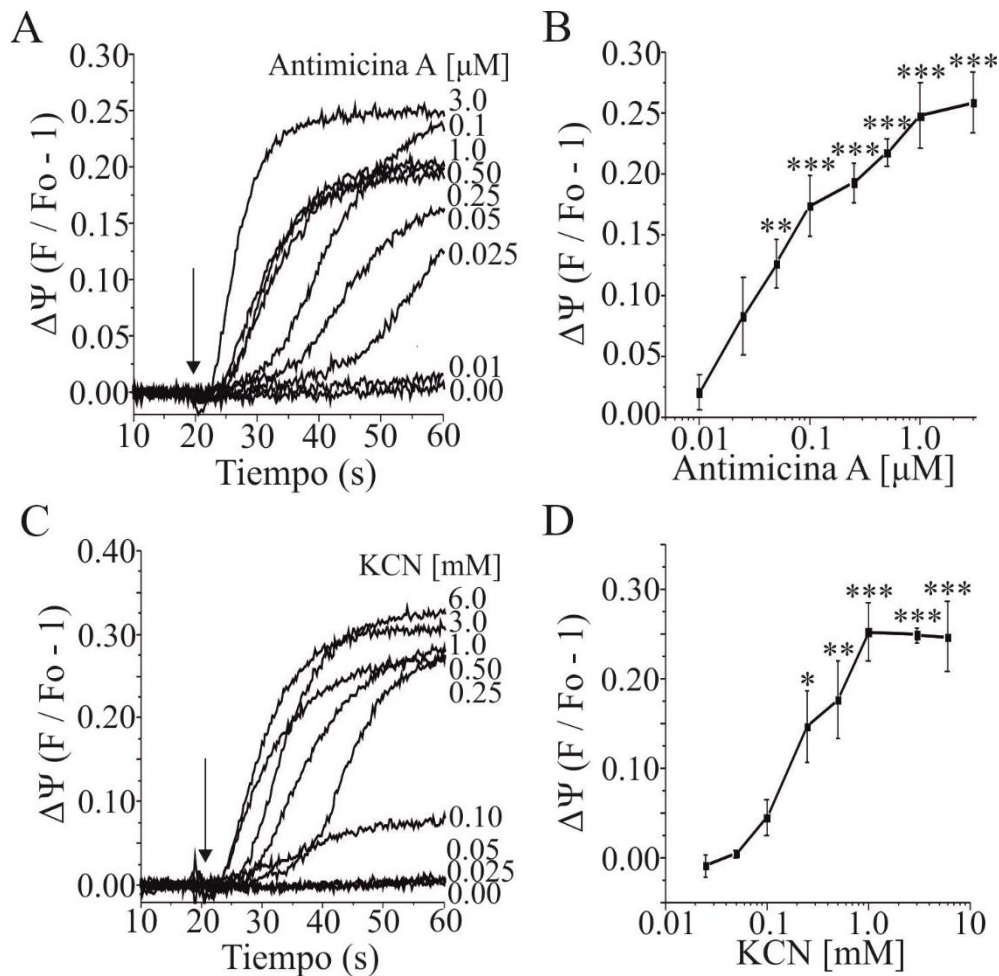


Fig. 8. La antimicina y el cianuro de potasio despolarizan la mitocondria de los espermatozoides permeabilizados. (A) Trazos representativos del aumento de fluorescencia (despolarización de la mitocondria o disminución del $\Delta\Psi$) de los

espermatozoides permeabilizados con digitonina y cargados con 30 nM de rod-123, tratados con diferentes concentraciones de antimicina (0.01 - 3 μ M) o (C) KCN (0.025 - 6 mM). La flecha indica la adición de los inhibidores. (B), (D) Muestran el resumen de los experimentos realizados como en A o en C respectivamente, evaluando el cambio de fluorescencia a los 50 s. Las barras representan la media \pm ES, n = 3-4. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Este resultado indica que la mitocondria de los espermatozoides permeabilizados con digitonina mantienen el $\Delta\Psi$ íntegro y que concentraciones ≥ 0.1 μ M de antimicina o ≥ 0.5 mM de KCN inhiben la actividad de la CTE. Dichas concentraciones están dentro del intervalo utilizado en mitocondrias aisladas (Baracca et al., 2003; Xiong et al., 2010; Zhang et al., 2009), lo cual es equivalente a tener los espermatozoides permeabilizados.

Después de inhibir la actividad de la CTE que alimenta el $\Delta\Psi$, expusimos las células a diferentes concentraciones de KCl externo. Bajo esta condición el $\Delta\Psi$ depende del gradiente electroquímico de K^+ (Di Lisa et al., 1995). Para esto, diluimos los espermatozoides permeabilizados en MI conteniendo diferentes concentraciones (0.1 - 40 mM) de KCl tratados con el ionóforo de K^+ , valinomicina, en presencia de 0.5 μ M de antimicina o de 0.5 mM de KCN. La Fig. 9A, B muestra los cambios de fluorescencia (debida a rod-123) inducidos con valinomicina a las diferentes concentraciones de KCl externo.

Los valores de $\Delta\Psi$ se obtuvieron al sustituir las diferentes concentraciones de KCl externo en la ecuación de Nernst y se asumió la $[K^+]_{mit}$ de 180 mM, de acuerdo con lo reportado para el espermatozoide de erizo de mar (Castellano et al., 1995). Resultados similares se obtuvieron en los espermatozoides tratados con KCN (Fig. 9C, D).

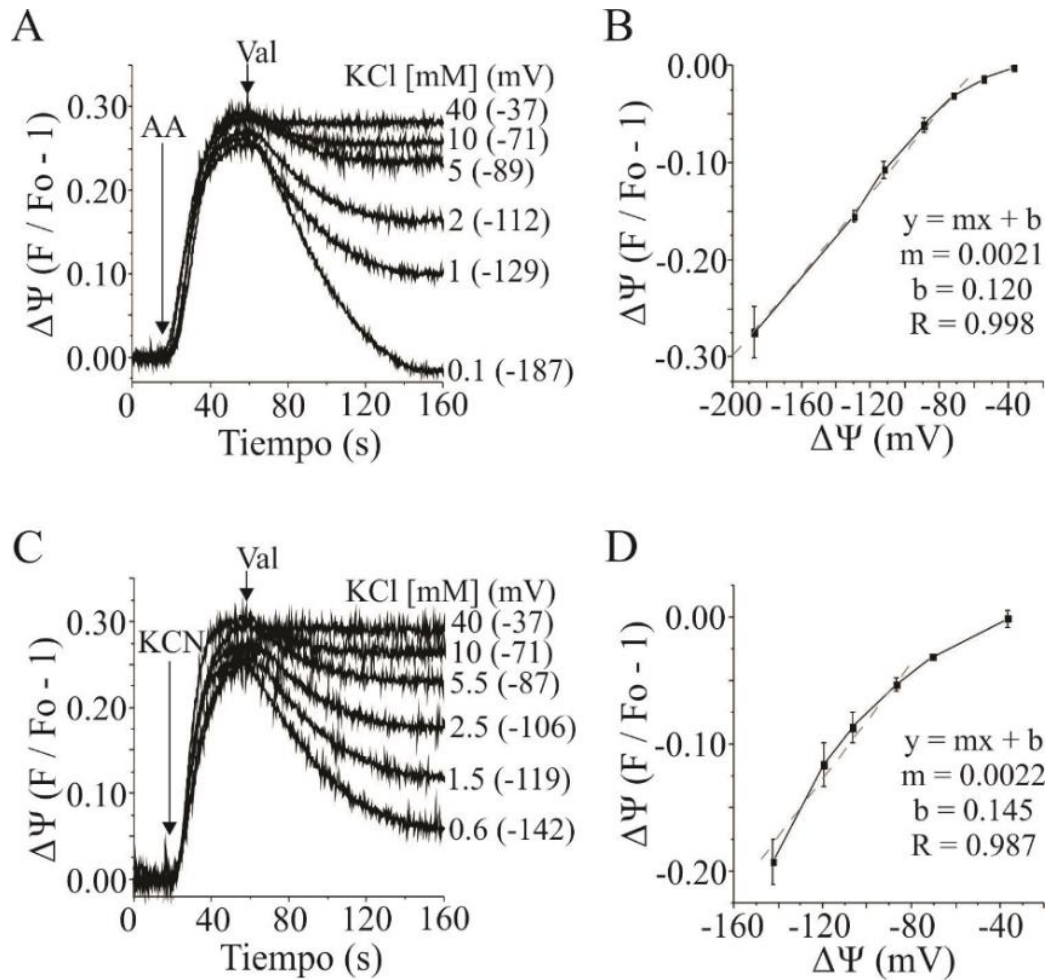


Fig. 9. Calibración del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides permeabilizados. (A) Trazos representativos del cambio de fluorescencia de los espermatozoides permeabilizados y cargados con rod-123 30 nM, tratados con antimicina (AA) 0.5 μ M o (C) con KCN 0.5 mM, y valinomicina (val) 2 μ M. Las flechas indican las adiciones. (B), (D) Muestra la correlación del cambio de fluorescencia evaluada como en (A) o en (C) a los 160 s con el $\Delta\Psi$ calculado con la ecuación de Nernst. Los datos se ajustaron con la Ec. de la recta (en gris). Los valores representan la media \pm ES, n = 4-5.

Además de la CTE, la F_0F_1 -ATP sintasa participa activamente en la regulación de $\Delta\Psi$, la principal fuerza impulsora que utiliza esta enzima para la síntesis de ATP (Foster et al., 2006). La F_0F_1 -ATP sintasa tiene la capacidad de funcionar en ambos sentidos de la reacción ($ATP \leftrightarrow ADP + P_i$); es decir, sintetizar ATP o acoplar la hidrólisis de esta molécula con la expulsión de H^+ al espacio intermembranaral para regenerar el $\Delta\Psi$ (Quarato et al., 2011). De acuerdo con esto, determinamos la contribución de la F_0F_1 -ATP sintasa (cuya actividad es sensible a oligomicina)

sobre el $\Delta\Psi$. La Tabla 1 muestra los valores de $\Delta\Psi$ de los espermatozoides permeabilizados en condiciones de reposo (succinato) o tratados con diferentes inhibidores mitocondriales.

Tratamiento	$\Delta\Psi$ (mV)
Succinato	- 172 \pm 13
Oligomicina 1 μ M	- 208 \pm 5 *
Antimicina A 1 μ M	- 65 \pm 5 ***
KCN 0.5 mM	- 92 \pm 5 ***

Tabla I. Determinación del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides permeabilizados. Los valores del $\Delta\Psi$ se obtuvieron a partir de los datos de las Fig. 8 y 9. El $\Delta\Psi$ en condiciones de reposo corresponde a los espermatozoides permeabilizados y diluidos en MI (succinato), en presencia de oligomicina, de antimicina o de KCN. Los valores representan la media \pm ES, n = 3-4. *p < 0.05, ***p < 0.001.

Nuestros resultados indican que la antimicina o el KCN, despolariza la mitocondria de los espermatozoides permeabilizados en tanto que la oligomicina la hiperpolariza, y es congruente con el hecho de que tanto la CTE como la F_0F_1 -ATP sintasa contribuyen en la regulación del $\Delta\Psi$. Considerando todo lo anterior y como está reportado (Emaus et al., 1986), encontramos que la rod-123 monitorea las variaciones de $\Delta\Psi$ de los espermatozoides permeabilizados, en una temporalidad de segundos. Debido a lo anterior, decidimos evaluar el $\Delta\Psi$ en espermatozoides intactos de erizo de mar de la especie *S. purpuratus*.

8.4. La rodamina-123 marca la mitocondria de los espermatozoides intactos de erizo de mar

El $\Delta\Psi$ es un parámetro que indica el estado energético mitocondrial (Kuznetsov et al., 2008), que impulsa la síntesis de ATP y regula los flujos iónicos, entre ellos la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (Kirichok et al., 2004; Wiedenmann et al., 2008). Para determinar la concentración de rod-123, que marque con fluorescencia específicamente la mitocondria de los espermatozoides intactos, expusimos las células a diferentes concentraciones (5-20 μ M) del fluoróforo. Nuestros resultados indican que 5 y 10 μ M de rod-123, marcan selectivamente la mitocondria de los espermatozoides de *S. purpuratus* (Fig. 10A), y que a la concentración de 20 μ M, la rod-123 se distribuye también en el citoplasma y en el acrosoma de algunas células. Como era de esperarse, el tratamiento con el protonóforo CCCP (un desacoplante mitocondrial que estimula el consumo de oxígeno

independiente de la actividad de la F_0F_1 -ATP sintasa) aumentó la fluorescencia de los espermatozoides marcados con 5 y 10 μM de rod-123, indicando una disminución del $\Delta\Psi$ (o una despolarización de la mitocondria) (Fig. 10B).

Dado que el CCCP afecta el ΔpH y el $\Delta\Psi$, nos preguntamos si el cambio de la fluorescencia de la rod-123 se debe a alteraciones en el ΔpH o en el $\Delta\Psi$. Para responder esta pregunta, evaluamos el efecto de la valinomicina (un ionóforo de K^+ que disipa el $\Delta\Psi$ (Johnson et al., 1981)) o el de la nigericina (un intercambiador de H^+/K^+ que colapsa el ΔpH (Akhmedov et al., 2010; Smiley et al., 1991)), sobre el $\Delta\Psi$, y encontramos que la valinomicina aumenta la fluorescencia de los espermatozoides marcados con rod-123, mientras que la nigericina la disminuye ligeramente (Fig. 10C), lo cual indica que los cambios de fluorescencia de la rod-123, corresponden al $\Delta\Psi$.

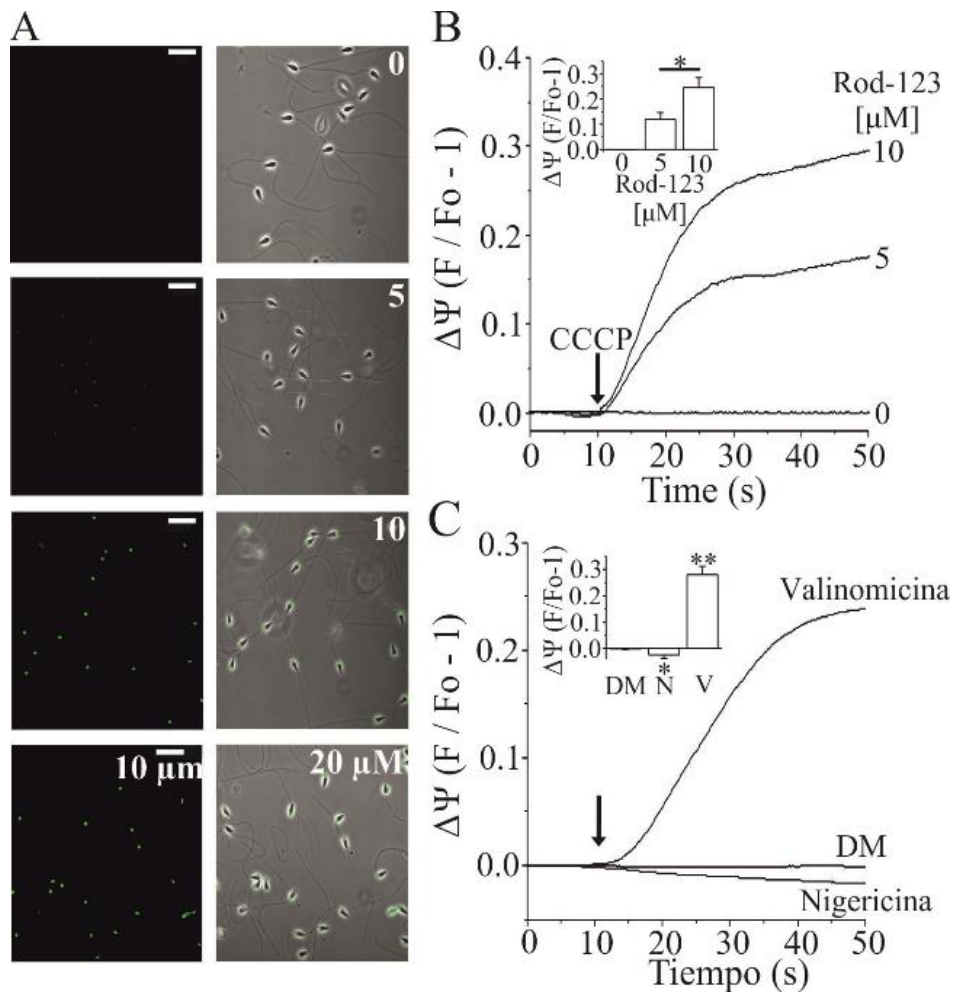


Fig. 10. La rodamina-123 marca la mitocondria de los espermatozoides intactos de *S. purpuratus*. (A) Los espermatozoides (diluidos 1:1000 en AMA) se marcaron con diferentes concentraciones (5-20 μM) de rod-123, como

se describió en Materiales y Métodos. Los paneles de la izquierda muestran la distribución de la fluorescencia de rod-123 en el espermatozoide por microscopía confocal, y los paneles de la derecha, la sobre-posición con las imágenes de contraste de fases observadas con un objetivo de 100x. (B) Registros representativos de los cambios de fluorescencia de espermatozoides cargados con 5 o 10 μM de rod-123 y tratados con 1 μM de CCCP, o (C) espermatozoides cargados con 10 μM de rod-123 y tratados con 5 μM de valinomicina o con 10 μM de nigericina. Las flechas indican las adiciones. Los insertos muestran el resumen estadístico del cambio de fluorescencia evaluada a los 30 s después de agregar el CCCP (B), dimetilsulfóxido (DM) como control, valinomicina (V) o nigericina (N) (C). Las imágenes en (A) son representativas y los registros en (B, C) son el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras representan la media \pm ES, * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

Con base en lo anterior, seleccionamos la concentración de 10 μM de rod-123 para evaluar el $\Delta\Psi$ de los espermatozoides de erizo de mar, además de que dicha concentración está dentro de los límites reportados en varios sistemas para ese fin (Foster et al., 2006; Kahlert et al., 2008; Schneckenburger et al., 2004; Toescu y Verkhatsky, 2000; Wyatt y Buckler, 2004)

8.5. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides de *S. purpuratus*

Aunque está reportado que la unión del speract a su receptor activa la respiración y la movilidad de los espermatozoides sin alterar el $\Delta\Psi$, debe señalarse que estos resultados se obtuvieron incubando los espermatozoides por periodos prolongados (> 3 h) (Christen et al., 1982; Repaske y Garbers, 1983; Schackmann et al., 1984). Ahora sabemos que los cambios (en el pH_i , en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la $[\text{Na}^+]_i$, entre otros) inducidos por speract en poblaciones de espermatozoides, ocurren en segundos (Rodríguez y Darszon, 2003). Considerando lo anterior, evaluamos si el speract causa cambios rápidos en el $\Delta\Psi$ en poblaciones de espermatozoides de *S. purpuratus*. La Fig. 11A, B muestra que concentraciones ≥ 0.25 μM de speract despolarizan la mitocondria del espermatozoide de erizo de mar, y que esta despolarización se bloquea aumentando la concentración de KCl extracelular ($[\text{KCl}]_{\text{ext}}$) de 10 mM (concentración normal en el AMA) a 40 mM, que inhibe toda la cascada de señalización disparada por speract con la excepción del aumento en el GMPc (González-Martínez y Darszon, 1987). La hiperpolarización inicial de la membrana plasmática del espermatozoide inducida por speract se debe a la apertura del canal de K^+ tetra-KCNG. En esta vía, con la excepción del aumento del GMPc, la alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ inhibe la hiperpolarización y bloquea la cascada de señalización disparada por speract. Como no hay un inhibidor específico para el canal tetra-KCNG, usamos esta estrategia como un control de la especificidad de la respuesta del espermatozoide al speract.

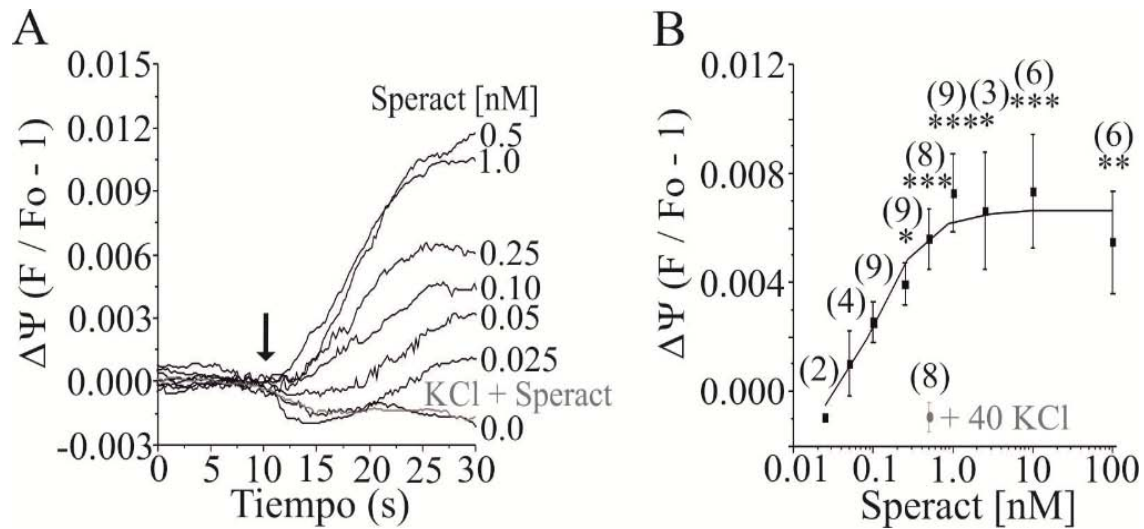


Fig. 11. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides de *S. purpuratus*. (A) Trazos representativos del cambio de fluorescencia del $\Delta\Psi$ de los espermatozoides estimulados con diferentes concentraciones (0.025 - 1 nM) de speract en ausencia o en presencia (speract 0.5 nM) de 40 mM de KCl, el cual se agregó un minuto antes de la adición del péptido. La flecha indica la adición del speract. (B) Resumen de los experimentos realizados en (A) a concentraciones de 0.025 - 100 nM de speract. La línea es el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann. El cambio de fluorescencia se evaluó a los 7 s después de agregar el speract, tiempo en el cual la $[Ca^{2+}]_i$ frecuentemente alcanza el máximo. El número de experimentos independientes se indica sobre las barras de error. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

8.6. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca^{2+}

El speract produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que depende de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ en los espermatozoides de erizo de mar (Schackmann y Chock, 1986; Wood et al., 2003, 2007), que podría influir en la mitocondria, lo cual es importante para la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Considerando lo anterior, examinamos si la despolarización de la mitocondria de los espermatozoides inducida por speract depende de la $[Ca^{2+}]_{ext}$. Contra lo esperado, encontramos que dicho péptido despolariza la mitocondria aun cuando los espermatozoides estén en agua de mar artificial (AMA) conteniendo únicamente 110 nM de Ca^{2+} (AMA0Ca, Fig. 12), condición que elimina el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Schackmann y Chock, 1986); es importante recordar que la concentración normal de Ca^{2+} en el AMA es de 10 mM. La Fig. 12B también muestra que la despolarización de la mitocondria inducida por speract es mayor en AMA0Ca que en AMA (ver discusión). El control en alta concentración de K^+ externo ($[K^+]_{ext}$), muestra como se esperaba, la dependencia de la respuesta a la hiperpolarización inicial de la membrana plasmática disparada por el speract.

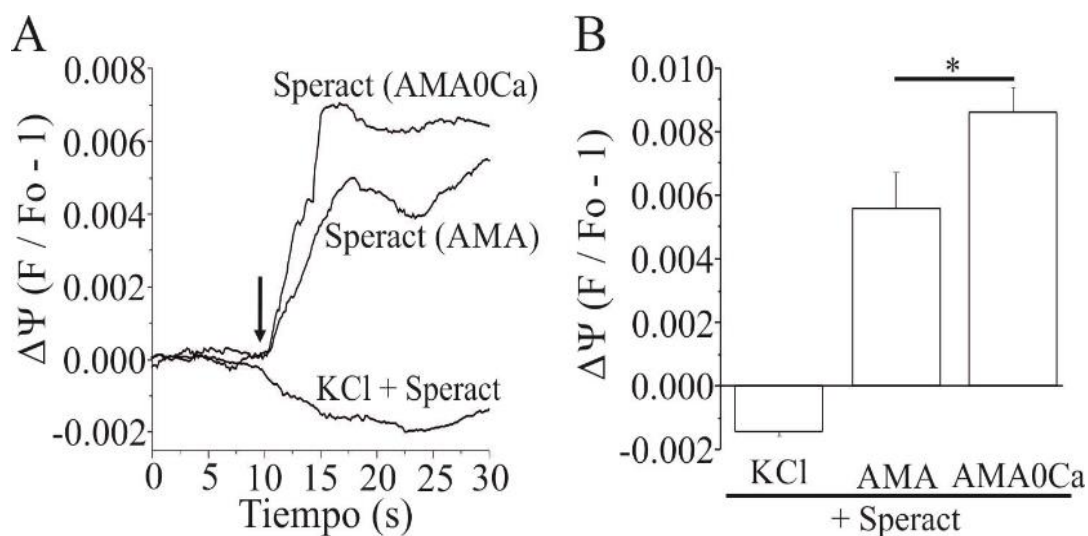


Fig. 12. El speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca^{2+} . (A) Trazos representativos del cambio de fluorescencia de $\Delta\Psi$ de los espermatozoides estimulados con 0.5 nM de speract en presencia (AMA) o en ausencia (AMA0Ca) de Ca^{2+} externo. Se utilizó 40 mM de KCl como control de la especificidad de la respuesta a speract en AMA, la flecha indica la adición de speract. (B) Resumen estadístico de los experimentos realizados en (A), evaluando el cambio de fluorescencia a los 7 s después de agregar el speract. Las barras representan la media \pm ES, $n = 4-6$. * $p < 0.05$.

8.7. El aumento artificial de pH intracelular despolariza la mitocondria de los espermatozoides

Como ya mostramos, el speract disminuye el $\Delta\Psi$ de los espermatozoides de erizo de mar aún en AMA0Ca, condición en la que el péptido eleva el pH_i de la célula (Schackmann y Chock, 1986). Por lo tanto, la despolarización de la mitocondria inducida por este decapeptido podría deberse al aumento de pH_i . Está reportado que al igual que speract el NH_4Cl aumenta el pH_i , la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y activa tanto la respiración como la movilidad de espermatozoides de *S. purpuratus* (Hansbrough y Garbers, 1981; Repaske y Garbers, 1983; García-Soto et al., 1987). Se sabe, que el aumento en el pH_i , en la respiración y en la movilidad ocurren independientes de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ (Christen et al., 1982, 1983; Schackmann et al., 1984; Rodríguez y Darszon, 2003). Como controles, nosotros corrobóramos que el speract aumenta el pH_i independientemente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ y que esta respuesta se inhibe por una alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$. Como lo anticipamos, la adición de NH_4Cl alcaliniza el pH_i inclusive en presencia de una alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ (Fig. 13). Además, se observó que el aumento en el pH_i inducido por el speract, es mayor en los espermatozoides de la condición de AMA0Ca.

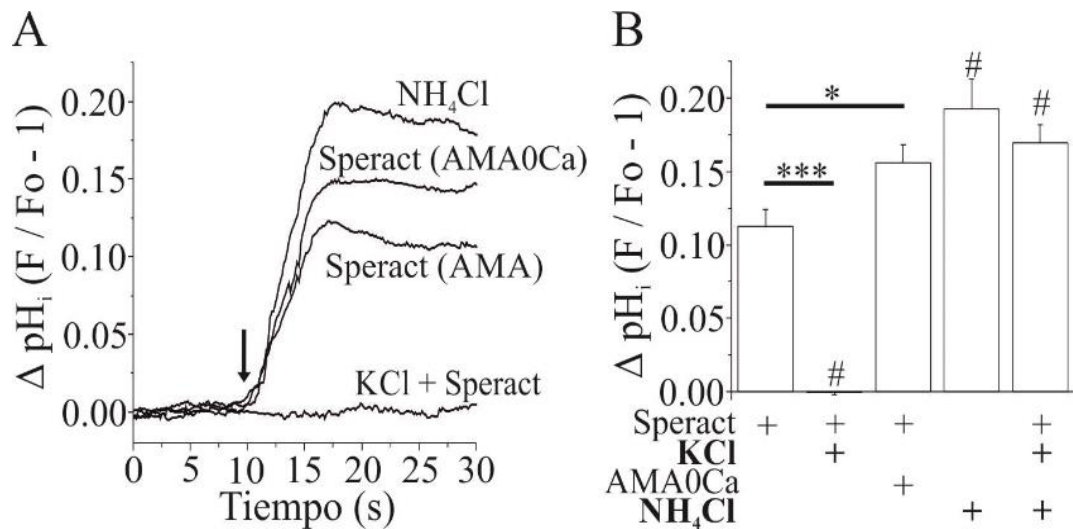


Fig. 13. El speract aumenta el pH intracelular de los espermatozoides independientemente de la concentración extracelular de Ca²⁺. (A) Trazos representativos del cambio de pH_i (ΔpHi) en los espermatozoides estimulados con 15 mM de NH₄Cl o con 0.5 nM de speract en presencia (AMA) o en ausencia de Ca²⁺ externo (AMA0Ca), o pre-tratados con 40 mM de KCl. La flecha indica las adiciones. (B) Resumen estadístico de los experimentos realizados en (A) evaluando el cambio de fluorescencia a los 7 s después de las adiciones. Las barras representan la media ± ES, n = 4-5. *p < 0.05; ***,#p < 0.001.

De acuerdo con nuestras expectativas, encontramos que la adición de NH₄Cl despolariza la mitocondria de los espermatozoides ya sea en presencia (Fig. 14A y B) o ausencia de la [Ca²⁺]_{ext} (Fig. 14C y D). A diferencia de la disminución de ΔΨ inducido por speract que se inhibe por una alta [K⁺]_{ext}, el NH₄Cl despolariza la mitocondria independientemente de la [K⁺]_{ext} (Fig. 14A inserto). Nuestros resultados sugieren que de las respuestas inducidas por la unión de speract a su receptor, es el aumento de pH_i, y no la elevación de la [Ca²⁺]_i o del GMPc, el que está relacionado con la despolarización de la mitocondria de los espermatozoides.

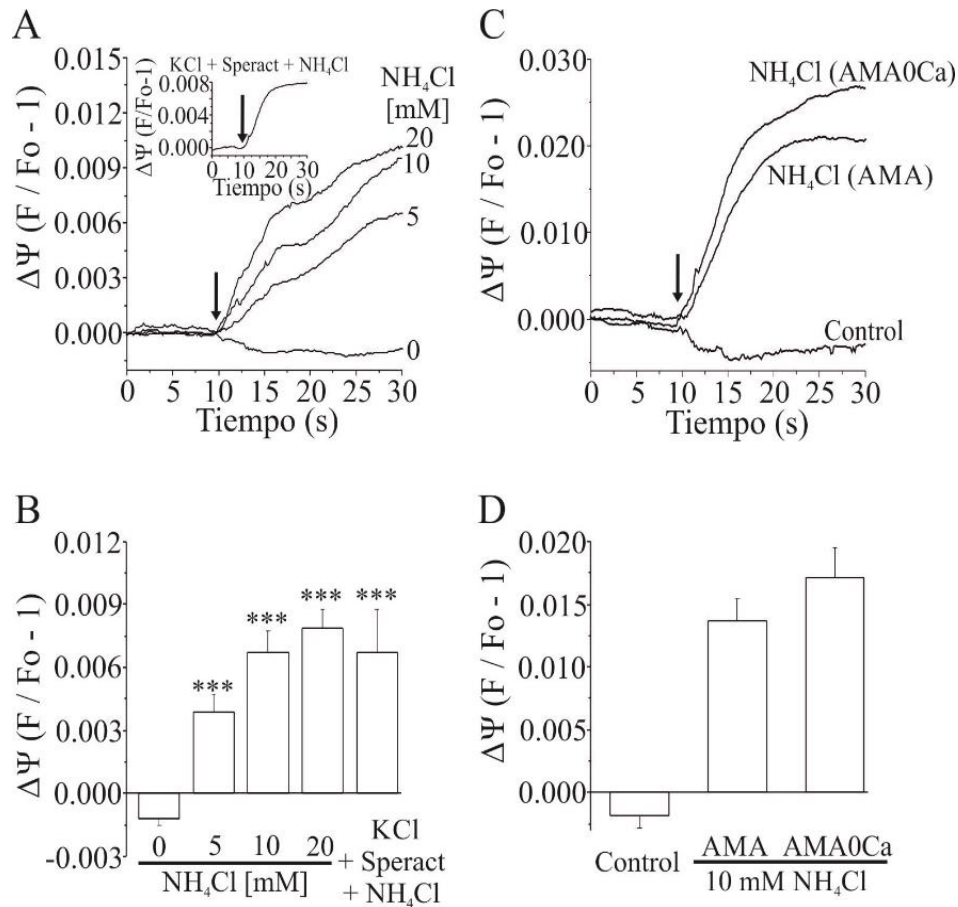


Fig. 14. El aumento artificial de pH intracelular mediante la adición de NH₄Cl despolariza la mitocondria del espermatozoide, incluso en ausencia de Ca²⁺ externo. Trazos representativos del cambio de fluorescencia de $\Delta\Psi$ de los espermatozoides tratados con diferentes concentraciones (5 - 20 mM) de NH₄Cl (A), o con 10 mM de NH₄Cl en presencia (AMA) o en ausencia (AMA0Ca) de Ca²⁺ externo (C). El inserto muestra la respuesta a 10 mM de NH₄Cl en espermatozoides previamente expuestos a 40 mM de KCl + 0.5 nM speract. El control corresponde a la adición de AMA como vehículo. Las flechas indican la adición de NH₄Cl o del vehículo. (B) y (D) Resumen estadístico de los experimentos realizados en A o en C, evaluando el cambio de fluorescencia a los 7 s después de la adición. Las barras representan la media \pm ES, n = 3-6. ***p < 0.001.

Considerando que la despolarización de la mitocondria inducida por speract está relacionada con el aumento del pH_i, examinamos cómo se afecta dicho cambio inducido por speract en presencia de compuestos que alteran la función mitocondrial. Primero se evaluó el efecto del protonóforo CCCP y de la rotenona (inhibidor del complejo I de la CTE), y causaron una acidificación aparente en los espermatozoides (Fig. 15A y B). Sin embargo, el hecho de que el colapso del Δ pH mitocondrial con CCCP elimine la aparente disminución de pH_i inducida por la rotenona (Fig. 15B), sugiere que en los espermatozoides de *S. purpuratus*, el BCECF también podría estar

entrando a la mitocondria, indicando que dicho organelo contribuye en los cambios de fluorescencia observados en las células. Como se esperaba, la oligomicina, un inhibidor específico de la F_0F_1 -ATP sintasa, no alteró el pH_i de los espermatozoides (Fig. 15A y B). El pretratamiento de los espermatozoides con rotenona u oligomicina, no altera significativamente el cambio de pH_i inducido por speract (Fig. 15C y D); no obstante, el hecho de que el pretratamiento con 2 μ M de CCCP inhibió parcialmente la respuesta inducida por speract (Fig. 15C y D), sugiere que el péptido también aumenta el pH mitocondrial. Estos resultados indican que los efectos causados por la rotenona u oligomicina no están relacionados con el aumento de pH_i inducido por speract debido a sus blancos mitocondriales.

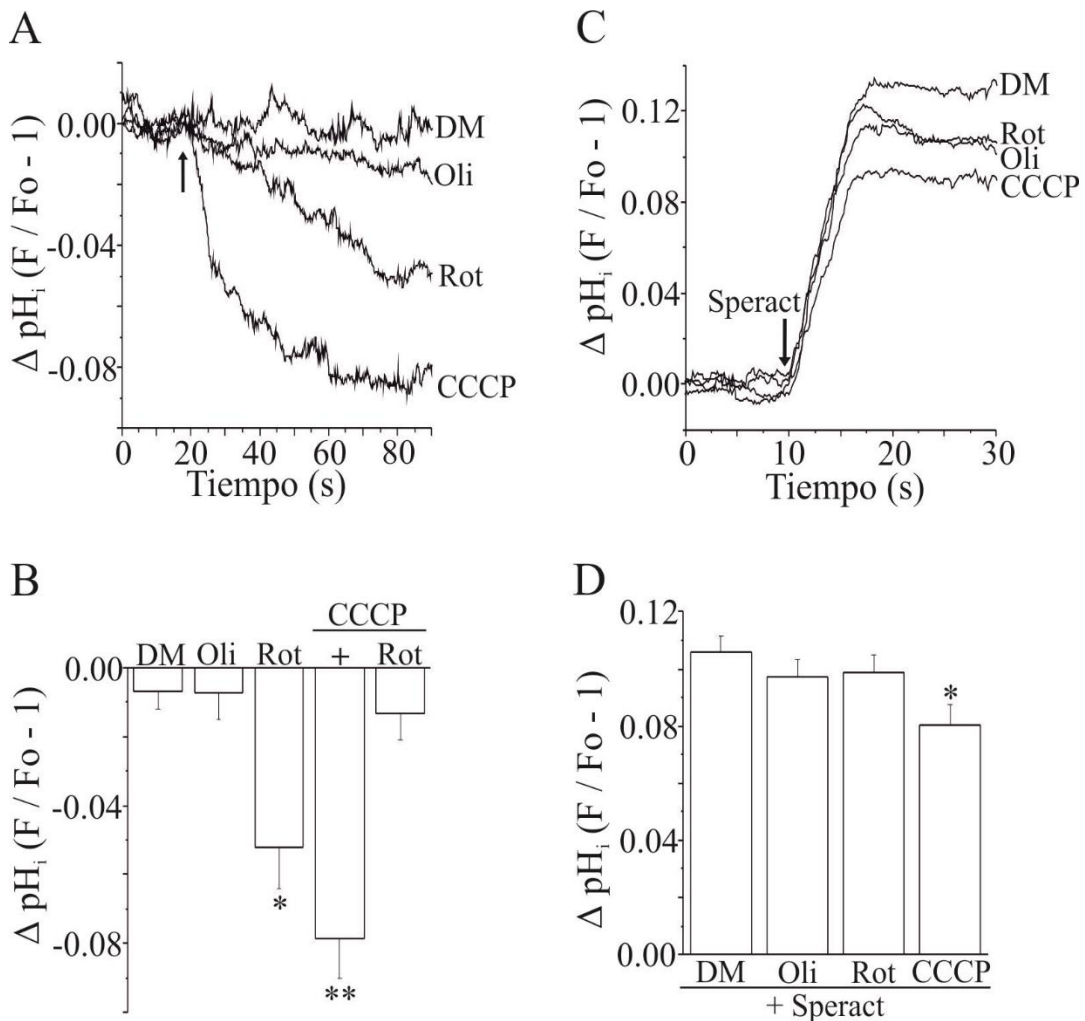


Fig. 15. La rotenona y el CCCP causan una acidificación aparente. (A) Trazos representativos del cambio de pH_i (ΔpH_i) en los espermatozoides tratados con dimetilsulfóxido (DM, control), 2 μ M de oligomicina (Oli), 1 μ M de rotenona (Rot) o 2 μ M de CCCP, o (C) 0.5 nM de speract se adicionó 2 min después de los inhibidores. Las flechas indican las adiciones. (B) y (D) Resumen de los experimentos realizados en A o en

C, respectivamente. Los cambios de pH_i se midieron a los 60 s después de adicionar los inhibidores mitocondriales o el CCCP, o a los 7 s después de agregar el speract. Las barras representan la media \pm ES, $n = 3-5$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

El CCCP y la rotenona inducen una acidificación en el espermatozoide, la cual podría explicarse por la actividad reversa de la F_0F_1 -ATPasa que expulsa los H^+ de la mitocondria, acidificando el citoplasma. Para saber si dicha acidificación depende de la F_0F_1 -ATPasa, pre-incubamos las células durante 3 minutos con 2 μM de oligomicina y luego las expusimos a CCCP (2 μM) o a rotenona (2 μM). La Fig. 16 muestra que ambos compuestos disminuyeron el pH_i independientemente de la actividad de la F_0F_1 -ATPasa, y este efecto también se observó en los espermatozoides permeabilizados con 100 μM de digitonina, concentración a la cual demostramos que la mitocondria es funcional (Fig. 7). Estos resultados confirman que el indicador BCECF AM entra a la mitocondria, y que tanto el CCCP como la rotenona acidifican la mitocondria independiente de la F_0F_1 -ATPasa.

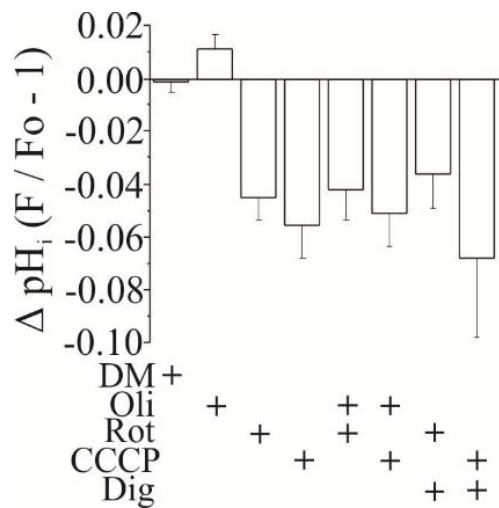


Fig. 16. El CCCP y la rotenona acidifican la mitocondria del espermatozoide. Los cambios de pH se registraron en los espermatozoides cargados con BCECF AM como se describió en Materiales y Métodos. Los cambios se evaluaron a los 120 s después de la adición de dimetilsulfóxido (DM, control), 2 μM de oligomicina (Oli), 2 μM de rotenona (Rot), 2 μM de CCCP o pretratados durante 3 min con 100 μM de digitonina (Dig) que permeabiliza selectivamente la membrana plasmática del espermatozoide, y luego los expusimos a la misma concentración de rotenona o de CCCP. Las barras representan la media \pm ES, $n = 3$.

8.8. La despolarización de la mitocondria inducida por speract depende parcialmente de la actividad de la FoF₁-ATPsintasa

La activación de la respiración y de la movilidad de los espermatozoides están relacionadas con la síntesis de ATP mitocondrial (Christen et al., 1983). Está reportado que a medida que la FoF₁-ATPasa mitocondrial sintetiza ATP, la mitocondria se despolariza parcialmente (Baracca et al., 2003). Para determinar si la despolarización de la mitocondria del espermatozoide inducida por speract, depende de la actividad de la FoF₁-ATPsintasa, expusimos los espermatozoides a la oligomicina. La Fig. 17A, C muestra que con la oligomicina se hiperpolariza la mitocondria del espermatozoide y que la despolarización inducida por speract es mayor en los espermatozoides expuestos a oligomicina (Fig. 17B, C). Esta observación indica que además de la FoF₁-ATPsintasa que contribuye a la despolarización de la mitocondria inducida speract, existen otros componentes importantes en la cascada de señalización activada por speract que podrían estar implicados en este evento.

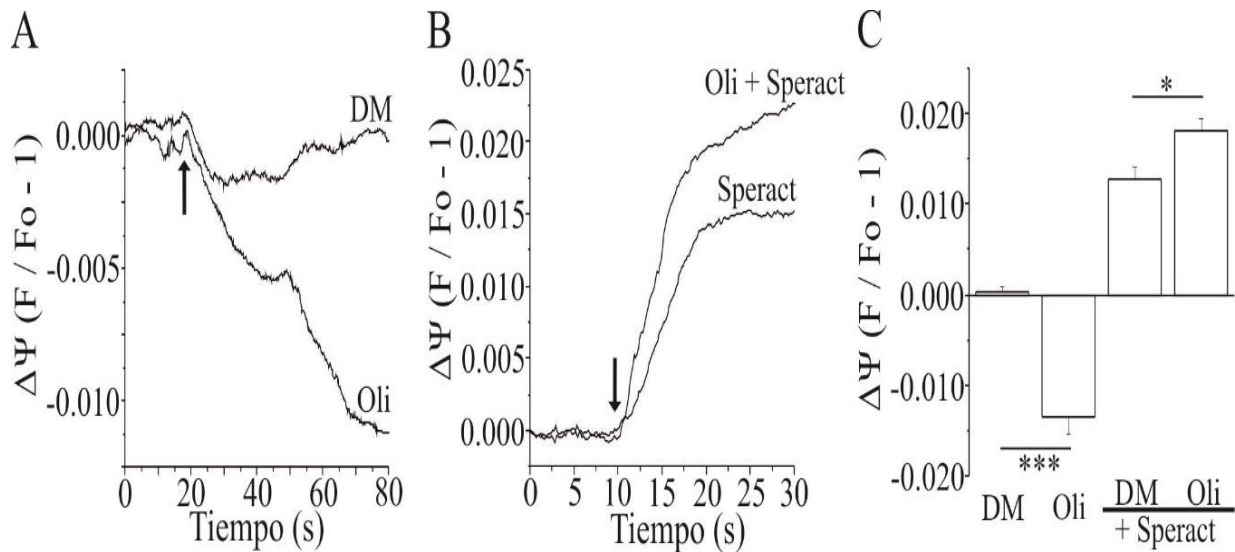


Fig. 17. La despolarización de la mitocondria inducida por speract depende parcialmente de la actividad de la FoF₁-ATPsintasa. Registros representativos del cambio de fluorescencia del $\Delta\Psi$ de los espermatozoides tratados con: dimetilsulfóxido (DM) como control, 2 μ M de oligomicina (Oli) (A), o (B) 0.5 nM de speract adicionado 2 min después del tratamiento con oligomicina. Las flechas indican el tiempo en que los compuestos se adicionaron. (C) Resumen de los experimentos realizados en A y en B. El cambio de fluorescencia se midió a los 60 s después de la adición de oligomicina, o 7 s después de la adición de speract. Las barras representan la media \pm ES, n = 3-5; *p <0.05; ***p <0.001.

8.9. El speract despolariza la mitocondria cuando está parcialmente desacoplada con CCCP

Se sabe que el protonóforo CCCP aumenta la permeabilidad de H^+ ocasionando un cortocircuito con la actividad de la CTE y, como se indicó anteriormente, causa una despolarización en la mitocondria (Fig. 18A y B). La Fig. 18C y D muestra que el speract aumenta la despolarización de la mitocondria causada por 0.1 μM de CCCP. Cabe mencionar, que en los espermatozoides previamente incubados con 0.1 μM de CCCP, el tratamiento con NH_4Cl produjo un efecto similar a speract (no mostrado). Sin embargo, el speract no afecta el $\Delta\Psi$ de los espermatozoides tratados con 2 μM de CCCP (Fig. 18C y D). Este resultado sugiere que el speract despolariza la mitocondria aun cuando está parcialmente desacoplada.

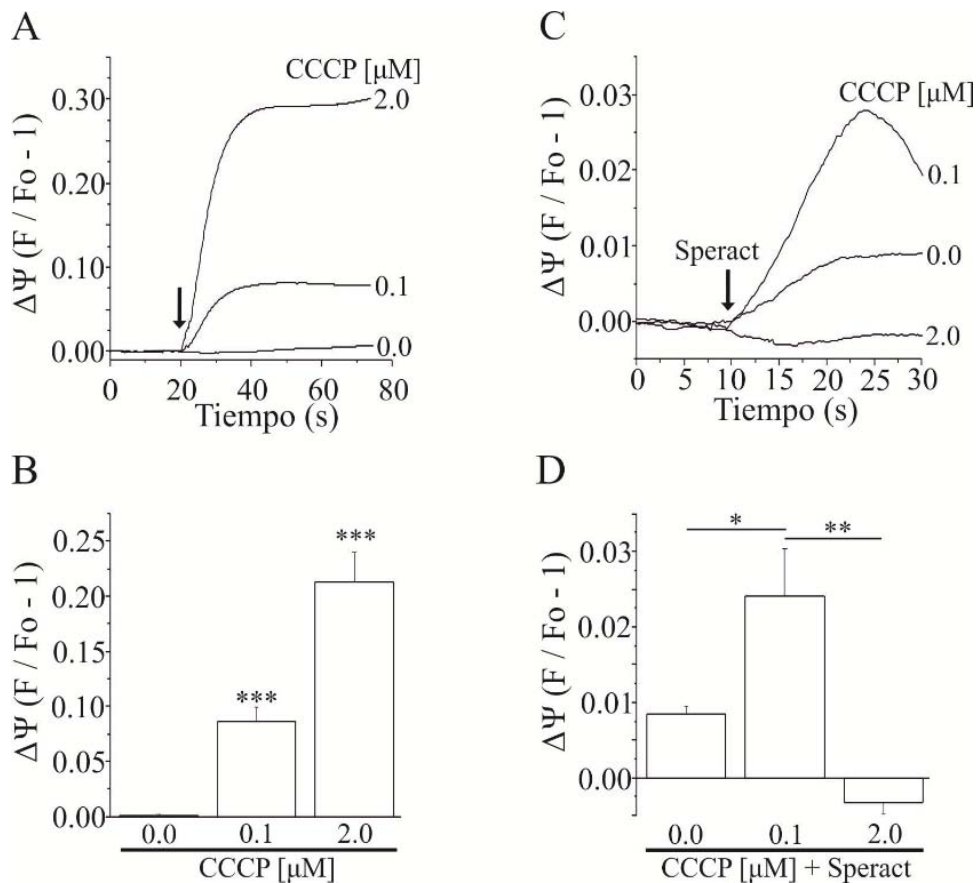


Fig. 18. La despolarización inducida por speract depende parcialmente del grado de desacoplamiento de la mitocondria. Registros representativos del cambio de fluorescencia del $\Delta\Psi$ de los espermatozoides tratados con 0.1 y 2 μM de CCCP (A), o (C) 0.5 nM de speract adicionado 2 min después del tratamiento. Las flechas indican el tiempo en que se adicionaron los compuestos. (B) y (D) Resumen de los experimentos realizados en A o en C respectivamente. El cambio de fluorescencia se midió a los 60 s después de la adición de CCCP, o 7 s después de la adición de speract. Las barras representan la media \pm ES, n = 3-5; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

8.10. La despolarización de la mitocondria inducida por speract involucra la actividad de la CPT-I

En diversos sistemas biológicos, está descrito que la entrada de los ácidos grasos libres (AGL) de cadena larga (CL; mayores de 14 átomos de carbono) (AGL-CL) a la mitocondria desacopla el organelo, estimula la respiración y disminuye el $\Delta\Psi$ (Wojtczak y Schonfeld, 1993; Oyanagi et al., 2011; Samartsev et al., 2011; Jabůrek et al., 2013). Dado que el speract despolariza la mitocondria de los espermatozoides, preguntamos si esta despolarización se debe a la entrada de los AGL-CL a través del sistema de transporte de las carnitinas. Para este fin, los espermatozoides se trataron con perhexilina (Rodríguez-Enríquez et al., 2015) o etomoxir (Selby y Sherratt, 1989), dos inhibidores de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I), la cual es considerada como la enzima limitante en el transporte de los AGL-CL a la mitocondria (Kennedy et al., 1996; McGarry y Brown, 1997). La Fig. 19A y B muestra que el etomoxir causa una pequeña despolarización mientras que la perhexilina induce una despolarización significativa.

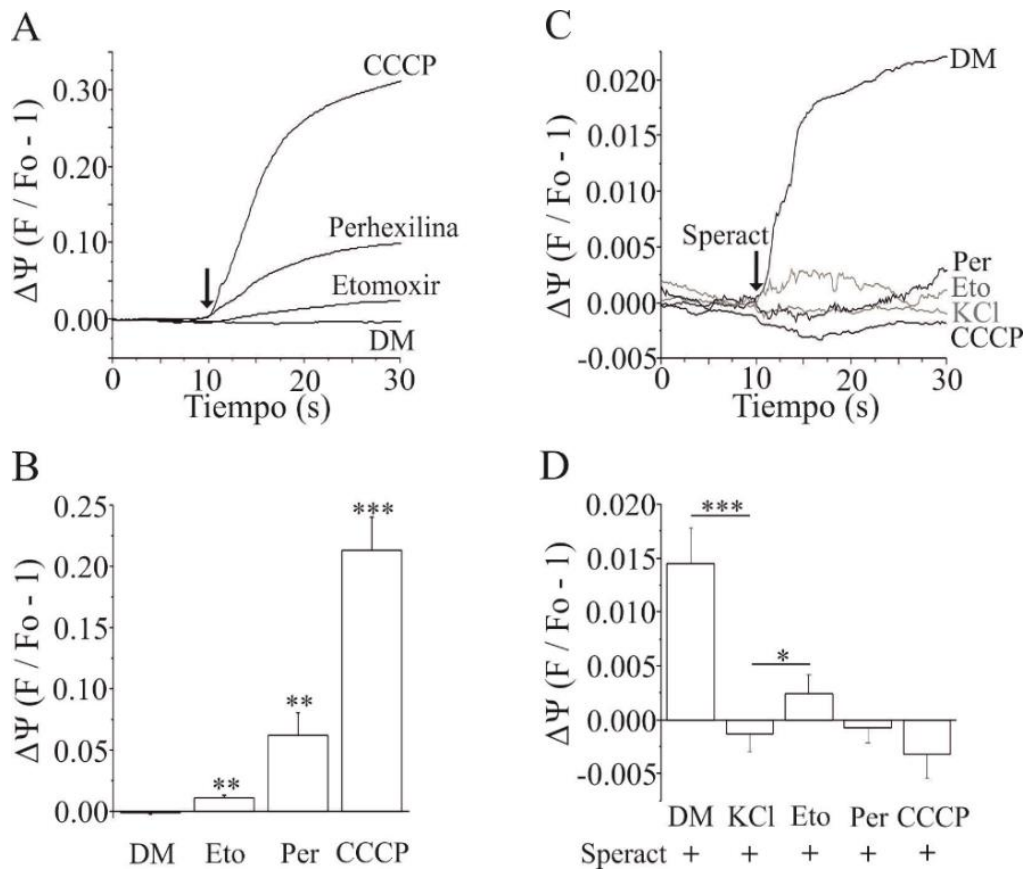


Fig. 19. El speract despolariza la mitocondria principalmente por la actividad de la CPT-I. (A) Registros representativos del cambio de fluorescencia del $\Delta\Psi$ de los espermatozoides tratados con: dimetilsulfóxido (DM, control), 0.5 mM de etomoxir, 25 μ M de perhexilina (Per) o 2 μ M de CCCP o (C) 0.5 nM de speract se adicionó 2 min (o 1 hr en el caso

de etomoxir) después de las mismas concentraciones de los inhibidores. Las flechas indican el tiempo en que se adicionaron los compuestos. (B) y (D) Resumen de los experimentos realizados en A o en C respectivamente, evaluando el cambio de fluorescencia a los 7 s después de la adición. Las barras representan la media \pm ES, n = 4; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

El efecto mencionado puede deberse a que además de inhibir a la β -oxidación a través de la CPT-I, la perhexilina también actúa como un desacoplante, como propusieron Labbe et al., (2008). Independientemente de la magnitud de la despolarización que inducen estos inhibidores, ambos eliminan (95 y 80%, respectivamente) la respuesta inducida por speract (Fig. 19C y D).

Lo anterior, sugiere que la CPT-I está involucrada en la despolarización de la mitocondria inducida por speract, y confirma que el espermatozoide de erizo de mar obtiene su energía por la oxidación de lípidos endógenos (Mita y Nakamura, 1998). Por otro lado, los ácidos grasos esterificados a concentraciones micromolares [$> 10 \mu\text{M}$] estimulan el consumo de oxígeno e inducen una despolarización transitoria de la mitocondria (Tominaga et al., 2008; Oyanagi et al., 2011), la cual puede estar relacionada con un efecto desacoplante. Este efecto, podría explicarse por un aumento en los AGL-CL causado por la fosfolipasa 2 (PLA2) sensible a pH alcalino que se localiza en la mitocondria del espermatozoide (Mita et al., 1991; Mita y Nakamura, 1998). En resumen, la despolarización de la mitocondria puede deberse a la suma de ambos procesos, es decir, tanto a la entrada excesiva de los AGL-CL esterificados vía CPT-I como a la liberación de AGL-CL no esterificados por la PLA2.

8.11. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido en el espermatozoide

Los niveles de NADH proporcionan información sobre el estado metabólico en términos de producción de energía. Dado que la mitocondria del espermatozoide de erizo de mar puede incorporar los AGL-CL través del sistema de la CPT para su oxidación y generar NADH y FADH_2 , nos preguntamos si la estimulación de los espermatozoides con speract altera los niveles de NADH. La Fig. 20 (A y D) muestra que el speract aumenta los niveles de NADH en los espermatozoides. Como se mencionó con anterioridad, el speract disminuye el $\Delta\Psi$ independientemente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. De manera similar, el péptido también aumenta los niveles de NADH en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 20A y D). Como la alcalinización de los espermatozoides con NH_4Cl reproduce la mayoría

de las respuestas del speract, encontramos que la adición del NH_4Cl también induce un aumento en los niveles de NADH, ya sea en presencia o en ausencia de Ca^{2+} externo (Fig. 20B y D). Contrario a la elevación de los niveles de NADH inducida por speract que se inhibe por una alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$, observamos que el aumento de NADH inducido por NH_4Cl no lo es (Fig. 20D). Este resultado sugiere que es el aumento de pH_i el que está relacionado con el aumento en los niveles de NADH y no el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Además, evaluamos cómo la rotenona, la oligomicina y el protonóforo CCCP, alteran los niveles de NADH en los espermatozoides de erizo de mar. Como se esperaba, la rotenona y la oligomicina aumentan los niveles de NADH, mientras que el CCCP los disminuye (Fig. 20, C y E). Este resultado concuerda con lo reportado en los espermatozoides de toro (Ho y Suarez, 2003) y en cardiomiocitos de ratón (Eng et al., 1989).

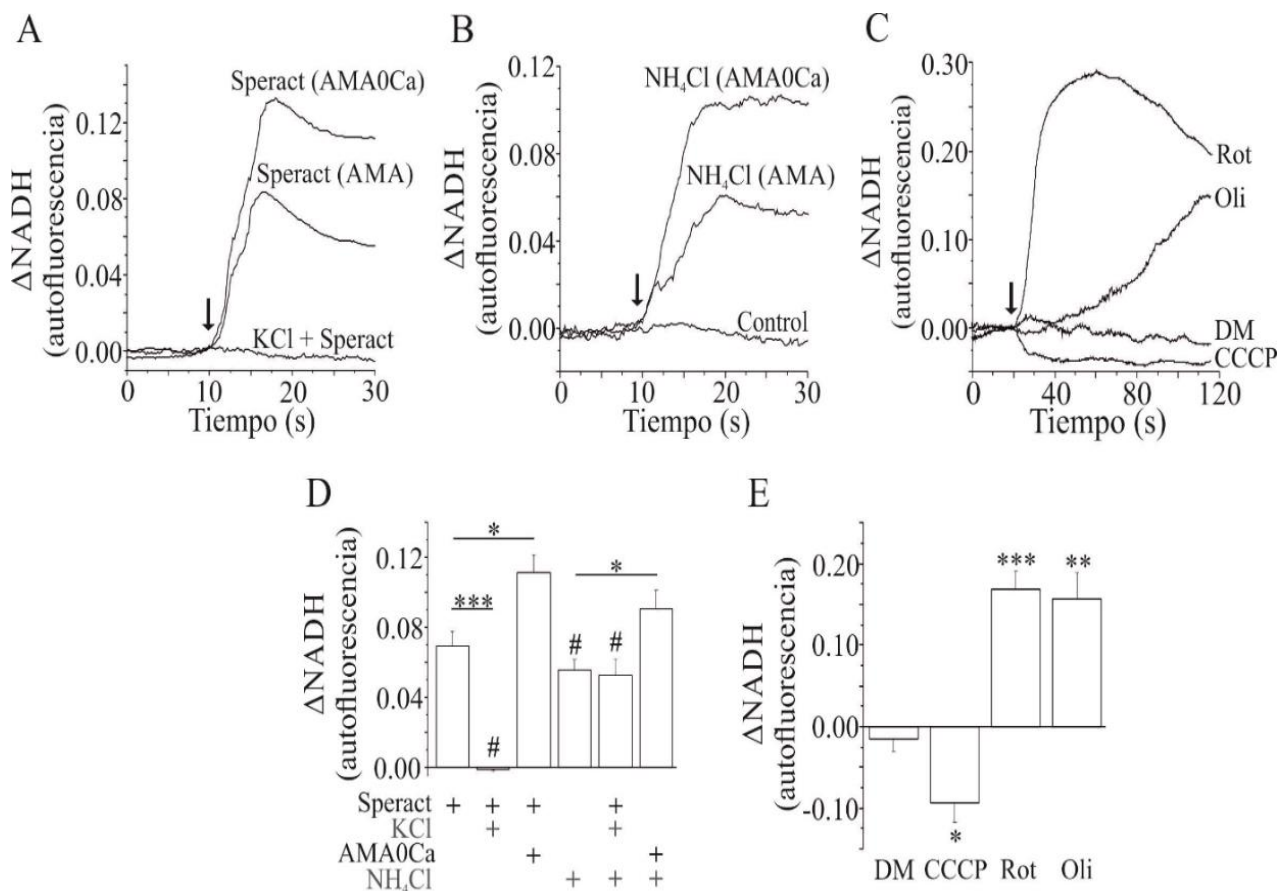


Fig. 20. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido. (A) Registros representativos del cambio (Δ) en la autofluorescencia de NADH en los espermatozoides de erizo de mar estimulados con 0.5 nM de speract, o (B) tratados con 15 mM de NH_4Cl , ya sea en presencia (AMA) o en ausencia (AMA0Ca) de Ca^{2+} externo,

o en presencia de 40 mM de KCl (0.5 nM de speract) adicionado un minuto antes del péptido, o (C) expuestos a dimetilsulfóxido (DM, control), 1 μ M de rotenona (Rot), 2 μ M de oligomicina (Oli) o 1 μ M de CCCP. (D) y (E) Resumen de los experimentos realizados en A y B o en D, respectivamente, evaluando el cambio de fluorescencia a los 7 s después de la adición de speract o de NH_4Cl , o 100 s después de la adición de los inhibidores o del CCCP. Las flechas indican el tiempo en que se adicionaron los compuestos. Las barras representan la media \pm ES, n = 4-7. *p <0.05; **p <0.01; ***,#p <0.001.

8.12. El speract aumenta los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido reducido mitocondrial debido a la oxidación de los ácidos grasos

Como el speract aumenta los niveles de NADH en el espermatozoide, es posible que este aumento se deba a la oxidación de AGL. Para probar esta hipótesis, evaluamos los niveles de NADH de los espermatozoides expuestos a los inhibidores de la CPT-I, la perhexilina y el etomoxir, y estimulando con speract o con NH_4Cl . La Fig. 21 (A y B) muestra que la perhexilina y el etomoxir disminuyen los niveles basales de NADH de una manera dependiente de su concentración. Además, observamos que los dos inhibidores eliminan la respuesta de los espermatozoides tanto a speract (Fig. 21C-F) como a NH_4Cl (recuadro Fig. 21D y F). Esto indica que el aumento en los niveles de NADH inducido por speract se debe a la oxidación de los FFA en la mitocondria.

Para saber si un ácido graso de cadena corta como el octanoato (que entra a la mitocondria por difusión simple (Banchio y Gramajo, 1997) sin utilizar el sistema de transporte de la carnitina (Fritz y Yue, 1963)) afecta los niveles de NADH, incubamos a los espermatozoides previamente con octanoato. La Fig. 22 muestra que ninguna de las concentraciones (1 – 50 mM) de octanoato altera el NADH basal o el aumento de NADH inducido por speract. Como se propuso anteriormente, este resultado sugiere que la CPT-I está implicada en la respuesta del speract. Sin embargo, se necesitan más experimentos para entender cómo la CPT-I participa en la vía de señalización del speract.

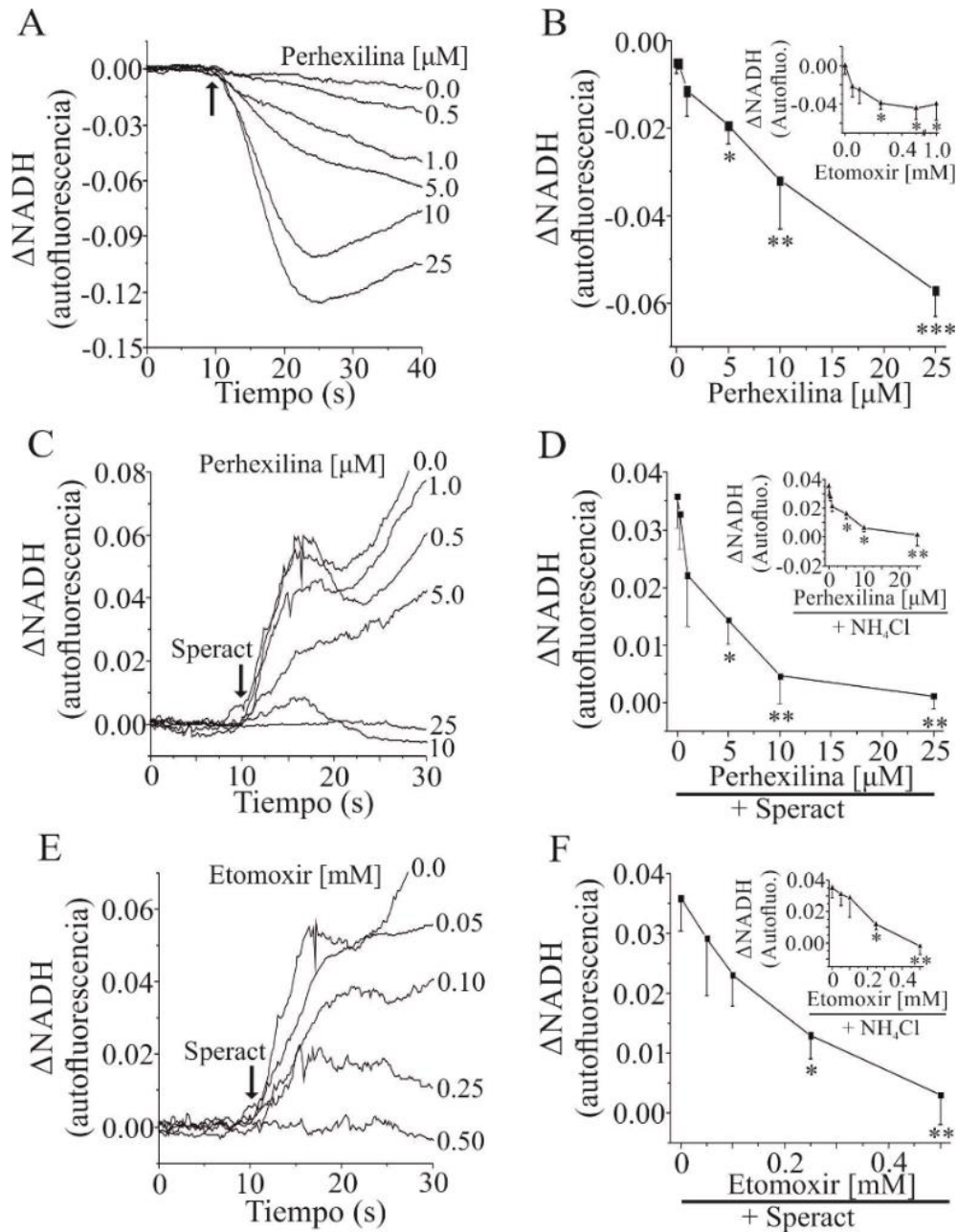


Fig. 21. El aumento de nicotinamida adenina dinucleótido reducido mitocondrial inducido por speract depende de la actividad de la CPT-I. (A) Registros representativos del cambio en la autofluorescencia de NADH de los espermatozoides tratados con diferentes concentraciones (0.5 – 25 μM) de perhexilina, o (C) agregando speract 0.5 nM a los 2 min después de las mismas concentraciones de perhexilina, o (E) una hora después de incubar las células a diferentes concentraciones (0.05 – 0.5 mM) de etomoxir. (B), (D) y (F) Resumen de los experimentos realizados en A, C o en E respectivamente, evaluando el cambio de la fluorescencia a los 7 s después de las adiciones, indicadas con las flechas. Los insertos en B, D o en F muestran el resumen de la autofluorescencia de NADH de los espermatozoides

pre-incubados una hora con etomoxir (B), o tratados con 15 mM de NH_4Cl en presencia de perhexilina (D) o de etomoxir (F). Las barras representan la media \pm ES, $n = 4$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

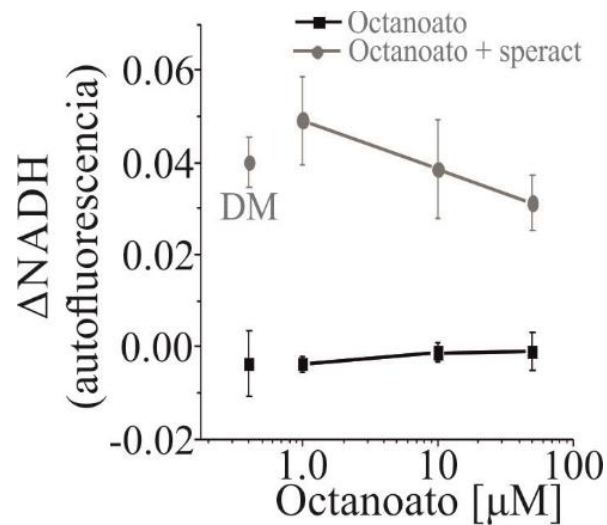


Fig. 22. El octanoato no altera el aumento de nicotinamida adenina dinucleótido reducido por speract. Los espermatozoides diluidos (1:10 en AMA1Ca) se incubaron con diferentes concentraciones (1 – 50 mM) de octanoato a 14 °C durante 3 horas en la oscuridad. Se evaluaron los cambios de autofluorescencia de NADH de los espermatozoides (como se describió en Materiales y Métodos) expuestos a dimetilsulfóxido (DM, control), o a diferentes concentraciones de octanoato en ausencia (línea negra) o en presencia de speract 0.5 nM (línea gris). Los valores representan la media \pm ES, $n = 3$.

Anteriormente mencionamos que el espermatozoide de erizo de mar obtiene su energía a partir de la oxidación de lípidos (Afzelius y Mohri, 1966; Hansbrough et al., 1980; Mita y Ueta, 1990; Mita y Nakamura, 1998), una vía que no involucra a la lactato deshidrogenasa (LDH), como se demostró previamente en los espermatozoides de erizo de mar del género *Paracentrotus* y *Arbacia* (Baccetti et al., 1975). La LDH cataliza la interconversión de piruvato a lactato con la participación del NAD^+ en ausencia de oxígeno (Nelson y Cox, 2005). Para saber si la LDH participa en el aumento de NADH inducido por speract, determinamos los niveles de NADH en la ausencia y en presencia de dos inhibidores de esta enzima, el gosispol y el ácido cinámico. La Fig. 23 muestra que ningún inhibidor afecta significativamente la respuesta de los espermatozoides a speract. Este resultado confirma que el aumento de NADH inducido por el decapeptido es independiente de la LDH, y concuerda con que el NADH que observamos proviene de la mitocondria.

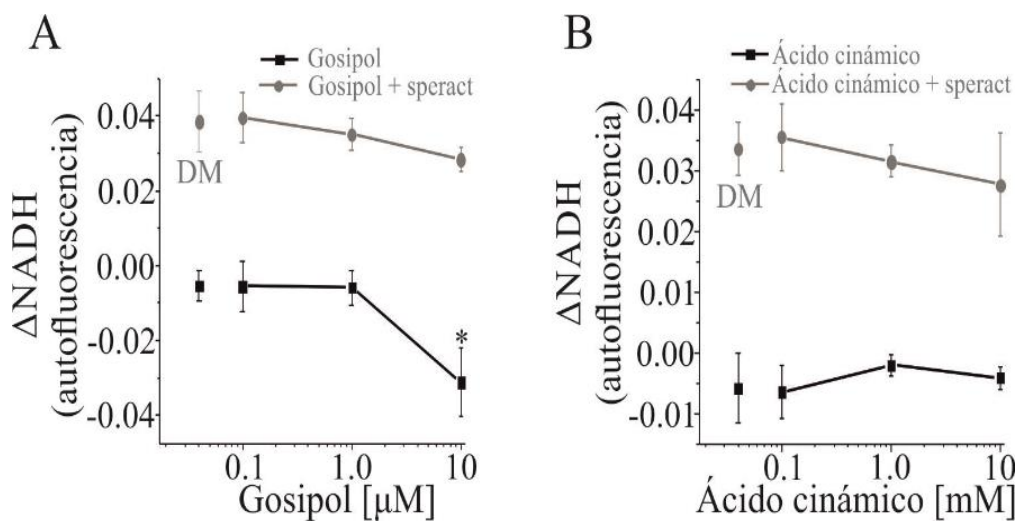


Fig. 23. El speract aumenta la nicotinamida adenina dinucleótido reducido independientemente de la lactato deshidrogenasa. Las mediciones de autofluorescencia de NADH de los espermatozoides, se realizaron (como se describió en Materiales y Métodos) preincubando a las células durante 2 min con dimetilsulfóxido (DM, control), o (A) con diferentes concentraciones de gossypol (0.1 – 10 μM), o (B) de ácido cinámico (0.1 – 10 mM), en ausencia (línea negra) o en presencia de speract 0.5 nM (línea gris). Los valores representan la media \pm ES. $n = 3$; $*p < 0.05$.

IX. DISCUSIÓN

La integridad del metabolismo energético mitocondrial depende principalmente del $\Delta\Psi$. Este cambio se puede determinar con indicadores fluorescentes relacionando la intensidad de su fluorescencia con el gradiente electroquímico de K^+ (Schackmann et al., 1984; Di Lisa et al., 1995). Permeabilizamos selectivamente la membrana plasmática de los espermatozoides de erizo de mar con digitonina y confirmamos la viabilidad de los mismos, como lo reportaron Castellano et al. (1995). En estas condiciones de permeabilización celular, el $\Delta\Psi$ de los espermatozoides se relaciona de manera lineal con el gradiente electroquímico de K^+ como si se tratara de mitocondrias aisladas. Como se esperaba, el tratamiento con antimicina o con KCN despolariza la mitocondria de los espermatozoides, mientras que la oligomicina la hiperpolariza. Este resultado concuerda con lo reportado en cardiomiocitos permeabilizados (Quarato et al., 2011), e indica que las actividades de la CTE y de la F_0F_1 -ATP sintasa contribuyen en la regulación del $\Delta\Psi$ de los espermatozoides permeabilizados mediante la fosforilación oxidativa.

La actividad de la CTE está estrechamente relacionada con el consumo de oxígeno mitocondrial, por lo cual las variaciones en el consumo de oxígeno podrían deberse a la actividad de la CTE que consecuentemente afecta el $\Delta\Psi$. A diferencia del estado 3 de la respiración que se regula por la F_0F_1 -ATP sintasa, el estado 4 se caracteriza por un bajo consumo de oxígeno, por los valores altos tanto en la [ATP] como en el $\Delta\Psi$ (hiperpolarización de la mitocondria), y se regula por la fuga de H^+ a través de la MMI (Emaus et al., 1986; Hafner et al., 1990). El metabolismo energético mitocondrial del espermatozoide intacto en estado inmóvil de erizo de mar es extremadamente bajo (estado 4) y aumenta (entre el estado 3 y 4) con la estimulación de la movilidad (Christen et al., 1986). El aumento del pH_i estimula de las dineínas unidas al axonema, iniciando la movilidad del espermatozoide, finamente relacionada con el metabolismo energético mitocondrial (Schackmann et al., 1984; Christen et al., 1986). La estimulación de los espermatozoides con speract produce un aumento de pH_i que altera el patrón de nado y aumenta la respiración (Repaske y Garbers, 1983; Guerrero et al., 2010), produciendo posiblemente variaciones en el $\Delta\Psi$.

Está establecido que el speract regula la movilidad del espermatozoide de *S. purpuratus* (Wood et al., 2005), e induce quimiotaxis en el espermatozoide de *L. pictus* mediante oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (Guerrero et al., 2010). Además, como ya mencionamos, nuestro grupo encontró que la

alteración de la función mitocondrial con inhibidores induce una entrada de Ca^{2+} dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ (Ardón et al., 2009). Estos resultados nos llevaron a pensar que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sería el principal regulador de la función mitocondrial. Para comprender mejor la relación entre la respuesta de los espermatozoides de erizo de mar a speract y la función mitocondrial, examinamos como este decapeptido afecta el $\Delta\Psi$. Nuestros resultados indican que el speract despolariza (disminuye el $\Delta\Psi$) la mitocondria de los espermatozoides de erizo de mar de *S. purpuratus*. Para nuestra sorpresa dicha respuesta es independiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$.

Como mencionamos en la sección de introducción y de resultados, en los espermatozoides de erizo de mar, el speract aumenta el GMPc, el cual abre el canal de K^+ tetra-KCNG, provocando una hiperpolarización de la membrana plasmática (E_m) (Galindo et al., 2000). Esta hiperpolarización, activa al intercambiador Na^+/H^+ y eleva el pH_i independientemente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ (Rodríguez y Darszon, 2003). Por lo anterior, cualquiera de los cambios mencionados (aumentos en el GMPc, en el pH_i o en la hiperpolarización de E_m), podría ser responsable de la disminución del $\Delta\Psi$ inducido por speract. En presencia de una alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ toda la cascada de señalización del speract se bloquea excepto una elevación importante de GMPc (Harumi et al., 1992). Dado que la despolarización de la mitocondria inducida por speract se inhibe por la alta $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$, es probable que sea el aumento en el pH_i y no el de GMPc lo que causa la despolarización mitocondrial. Esta posibilidad se mencionó hace mucho tiempo (Schackmann et al., 1984), sin embargo, nunca se realizaron los experimentos correspondientes para demostrarlo.

Corroboramos, como está reportado (Rodríguez y Darszon, 2003) para los espermatozoides de erizo de mar, que el aumento de pH_i inducido por speract es independiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. De hecho, observamos que dicho aumento es mayor en ausencia de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. En tal condición, la entrada de Na^+ a través del intercambiador Na^+/H^+ es mayor (Rodríguez y Darszon, 2003), posiblemente debido a que la hiperpolarización de la membrana plasmática causada por speract es mayor (Reynaud et al., 1993). Lo anterior podría explicar, al menos en parte, por qué el aumento de pH_i inducido por speract es mayor en ausencia de Ca^{2+} . De hecho, en este trabajo observamos que la despolarización de la mitocondria inducida por speract también es mayor en ausencia de Ca^{2+} externo, lo cual coincide con la hipótesis, que el aumento de pH_i causado por speract conduce a la despolarización de la mitocondria. Nuestros resultados confirmaron esta hipótesis y muestran que

el aumento artificial del pH_i mediante la adición de NH_4Cl (González-Martínez y Darszon, 1987), despolariza la mitocondria de los espermatozoides, incluso en ausencia de Ca^{2+} externo (AMA0Ca).

Al evaluar el ΔpH_i de espermatozoides expuestos a CCCP, contrario a lo reportado (Christen et al., 1983), observamos que el CCCP induce una aparente acidificación del espermatozoide. Como sucede en mitocondrias aisladas de corazón de rata (Kapus et al., 1989; Reers et al., 1989) o en células intactas (Takahashi et al., 2001; Abad et al., 2004), el CCCP acidifica la mitocondria del espermatozoide. De hecho, observamos que el BCECF-AM también se distribuye dentro de la mitocondria, y en consecuencia, el CCCP causa una disminución de la fluorescencia dentro de este organelo. Tal acidificación también se observó en los espermatozoides expuestos a rotenona, y se eliminó al colapsar el ΔpH mitocondrial con $2 \mu M$ de CCCP. Estos resultados sugieren que la señal de acidificación del pH_i tiene un componente mitocondrial y concuerda con la hipótesis de que el CCCP y la rotenona reducen el pH mitocondrial. Además, la exposición de los espermatozoides a oligomicina no alteró significativamente el pH_i , congruente con un reporte previo (Hansbrough y Garbers, 1981). Al evaluar el ΔpH_i inducido por speract en espermatozoides expuestos a rotenona u oligomicina, no observamos efectos significativos. Por el contrario, el colapso del ΔpH mitocondrial con $2 \mu M$ CCCP disminuye el ΔpH_i inducido por speract. El hecho de que el protonóforo CCCP también afecte a la membrana plasmática además de la mitocondrial, sugiere que es posible que el speract aumente tanto el pH citoplasmático como el mitocondrial en el espermatozoide de erizo de mar, posibilidad que requiere estudiarse.

Como ya mencionamos, el aumento de pH_i inducido por speract estimula a las dineínas, que están finamente acopladas con la síntesis de ATP mitocondrial y con la regulación de la movilidad del espermatozoide de erizo de mar (Christen et al., 1983). La fosforilación oxidativa acopla la actividad de la CTE que genera el gradiente electroquímico de H^+ y la F_0F_1 -ATP sintasa mitocondrial que lo consume para sintetizar el ATP. La estimulación de la actividad de la F_0F_1 -ATP sintasa, consume más $\Delta \Psi$ y consecuentemente la mitocondria se despolariza (Baracca et al., 2003). De acuerdo con esto, encontramos que la inhibición de la F_0F_1 -ATP sintasa con oligomicina hiperpolariza la mitocondria de los espermatozoides, y que en esta misma condición, el speract causa una mayor despolarización de la mitocondria. Esto sugiere que aunque la actividad de la

F₀F₁-ATP sintasa modula la despolarización de la mitocondria inducida por speract, no es el principal factor que controla esta respuesta, y por tanto existe otro factor implicado.

La entrada de los ácidos grasos libres (AGL) de cadena larga (CL; mayores de 14 átomos de carbono) (AGL-CL) en las mitocondrias aisladas de músculo cardiaco de rata alteran la función mitocondrial; dicha entrada está mediada por la activación de la CPT-I, sensible a pH alto, la cual alimenta a la β-oxidación (Bezaire et al., 2004; Bonnefont et al., 2004). De acuerdo con lo anterior, encontramos que la inhibición de la CPT-I con etomoxir o perhexilina, elimina la despolarización mitocondrial inducida por speract. Esto concuerda con la idea de que la entrada de los AGL-CL a la mitocondria a través del sistema de transporte de la carnitina provoca una despolarización de dicho organelo y está directamente relacionada con el aumento de pH_i inducido por speract. Esto se confirmó al observar que la despolarización de la mitocondria inducida por una alcalinización intracelular con NH₄Cl, también se elimina por los inhibidores de la CPT-I.

La β-oxidación de los AGL-CL en la mitocondria produce NADH y FADH₂, que alimentan a la CTE. Encontramos que la estimulación de los espermatozoides con speract aumenta los niveles de NADH independientemente de la [Ca²⁺]_{ext}, y que esta respuesta se inhibe por una alta [K⁺]_{ext}. Una posibilidad es que el aumento de pH_i inducido por speract, sea el responsable de elevar los niveles de NADH en el espermatozoide. De acuerdo con lo anterior, observamos que el aumento artificial del pH_i con NH₄Cl, elevó los niveles de NADH en el espermatozoide, incluso en ausencia de Ca²⁺ externo (AMA0Ca). También confirmamos que la inhibición de la CTE con rotenona o de la F₀F₁-ATP sintasa con oligomicina aumenta los niveles de NADH mientras que el CCCP los disminuye.

Para establecer que el aumento de NADH disparado por el speract está relacionado con la actividad de la CPT-I, se probaron dos inhibidores de dicha enzima, la perhexilina y el etomoxir. Nuestros resultados mostraron que ambos inhibidores (a concentraciones de 25 μM y de 0.5 mM, respectivamente) previenen el aumento de NADH inducido por speract o por NH₄Cl. Es importante señalar que la perhexilina también inhibe los canales de Ca²⁺ tipo “L” (IC₅₀ = 0.83 μM (Barry et al., 1985)) presentes funcionalmente en el espermatozoide de erizo de mar (Granados-Gonzalez et al., 2005). Esto sugiere que la perhexilina puede alterar la homeostasis del Ca²⁺_i en el espermatozoide el cual es innecesario para la estimulación de la mitocondria por el speract.

Además, la perhexilina también inhibe a canales de K^+ tales como HERG ($IC_{50} = 1.5 \mu M$ (Walker et al., 1999) y $K_v1.5$ ($IC_{50} = 1.5 \mu M$ (Rampe et al., 1995)); sin embargo, hasta la fecha estos canales no se han descrito en el espermatozoide de erizo de mar. Considerando lo anterior, no podemos descartar la posibilidad de que perhexilina también afecte a los canales mencionados en nuestro modelo.

Puesto que el espermatozoide de erizo de mar carece de la glucólisis (Rothschild, 1948; Hansbrough et al., 1980; Mita y Nakamura, 1998), obtiene su energía través de la oxidación de fosfolípidos endógenos, particularmente de la fosfatidilcolina (PC) que colocaliza en el área mitocondrial con la fosfolipasa A2 (PLA2) cuya actividad es sensible al pH (Mita et al., 1991). El aumento de pH_i de 6.5 a 7.5 estimula tanto la oxidación de los ácidos grasos como la actividad de la PLA2, coincidiendo con el inicio de la movilidad y de la activación de la respiración (Mita et al., 1990). El aumento de pH_i inducido por speract también puede activar a la PLA2, y aumentar la [AGL-CL] induciendo una despolarización parcial de la mitocondria (posiblemente mediante un efecto desacoplante (Wojtczak y Schonfeld, 1993)). También la estimulación de la oxidación de la PC (Mita y Ueta, 1990) podría aumentar los niveles de NADH.

También se observó que la exposición secuencial de los espermatozoides de erizo de mar a speract y luego a NH_4Cl , no causó ningún efecto aditivo sobre los niveles de NADH similar a lo reportado previamente para el consumo de oxígeno (Repaske y Garbers, 1983). Este resultado sugiere que el mecanismo de acción del speract sobre la estimulación del metabolismo mitocondrial está mediado por el aumento del pH_i . Este aumento de pH_i estimula a las dineínas del espermatozoide, que hidrolizan el ATP, disminuyendo su concentración (Christen et al., 1982, 1983, 1986) y aumentando la del ADP. Podría ser que para satisfacer la demanda energética, el aumento de pH_i inducido por speract, estimule las actividades de la CPT-I (Bezaire et al., 2004) y de la PLA2 (Mita et al., 1990, 1991) para alimentar con ácidos grasos a la β -oxidación aumentando el NADH y restaurando el $\Delta\Psi$, necesario para la síntesis de ATP, a partir del ADP generado durante la movilidad del espermatozoide.

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que el NADH se produce en la mitocondria por la oxidación de AGL, sensible al aumento de pH_i inducido por speract.

X. CONCLUSIÓN

Considerando los resultados de este estudio y los reportados previamente (Alvarez et al., 2014; Darszon et al., 2011; Nishigaki et al., 2014), nuestra hipótesis de trabajo de la participación de la mitocondria en la respuesta de los espermatozoides de *S. purpuratus* a speract, es la siguiente: la unión del speract a su receptor ubicado en el flagelo del espermatozoide aumenta el GMPc, el cual abre el canal de K⁺ tetra-KCNG, induciendo una hiperpolarización del Em (Lee y Garbers, 1986; Galindo et al., 2000). Esta hiperpolarización, activa el intercambiador Na⁺/H⁺, aumentando el pH_i (Lee, 1985) que activa al canal CatSper (sensible a pH_i) y eleva la [Ca²⁺]_i (Seifert et al., 2015). Aunque se reportó que la alteración de la función mitocondrial influencia la [Ca⁺]_i (Ardón et al., 2009), el presente trabajo muestra que es el aumento de pH_i inducido por speract el que coordina finamente el aumento de NADH y la despolarización mitocondrial (Fig. 24A). Dicho aumento, estimula a las enzimas dependientes de pH como la CPT-I (Bezaire et al., 2004), y la PLA2 (Mita et al., 1990, 1991) para alimentar a la β-oxidación (Eaton et al., 1996) y estimular la entrada de los AGL (Jezek et al., 1998) en la mitocondria, respectivamente, aumentando los niveles de NADH que alimentan a la CTE para regenerar el ΔΨ. La entrada de los AGL en la mitocondria podría explicar el aumento del consumo de oxígeno inducido por speract (Repaske y Garbers, 1983), y la despolarización de la mitocondria. La CTE consume el NADH para regenerar el ΔΨ necesario para que la F₀F₁-ATP sintasa provea de energía al espermatozoide (Fig. 24B). Corroboramos que el aumento de pH_i de los espermatozoides con NH₄Cl, incluso en ausencia de [Ca²⁺]_{ext} o en presencia de una alta [KCl]_{ext}, reproduce las respuestas del speract en los espermatozoide de erizo de mar. Los resultados de este trabajo en su conjunto, indican que el aumento de pH_i inducido por speract, influye en el ΔΨ y en los niveles de NADH, los cuales junto con el resto de los cambios inducidos por speract (hiperpolarización del Em, aumentos en el GMPc y AMPc, en el Ca²⁺ y en el Na⁺) orquestan el nado del espermatozoide.

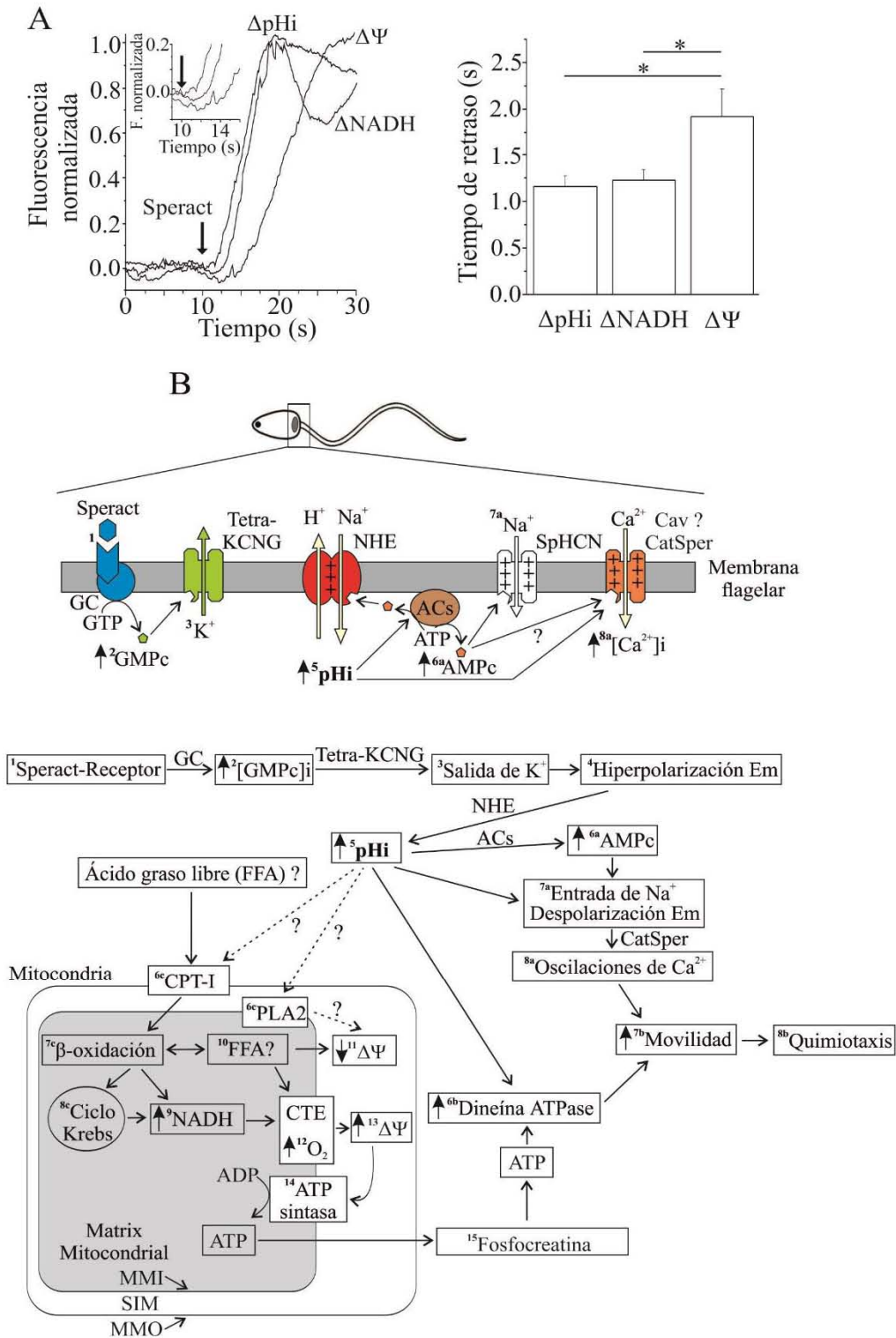


Fig. 24. Modelo propuesto para la activación del metabolismo energético mitocondrial inducido por speract. (A) Registros representativos que comparan los cambios cinéticos de pHi , los niveles de NADH y del $\Delta\Psi$ en el espermatozoide de erizo de mar estimulado por speract (izquierda), y el análisis estadístico evaluando el “tiempo de retraso”, a partir de la adición speract indicada por la flecha, al punto del aumento de pHi , NADH o de $\Delta\Psi$ (derecha).

Las barras representan la media \pm ES. n = 9-13, *p < 0.05. (B) ¹La unión del speract a su receptor acoplado a la guanilato ciclasa (GC) en el flagelo del espermatozoide ²aumenta la [GMPc], que abre el canal de K⁺ tetra-KCNG, e induce la salida de ³K⁺ y una ⁴hiperpolarización transitoria de la Em (Lee y Garbers, 1986; Galindo et al., 2000). Esta hiperpolarización activa el intercambiador Na⁺/H⁺ y ⁵aumenta el pH_i (Lee, 1985; Nishigaki et al., 2014). El aumento de pH_i estimula: a la AC soluble (ACs) ^{6a}aumentando la [AMPc] (Vacquier et al., 2014), ^{6b}a la dineína (Christen et al., 1983), ^{6c}a la CPT-I (Bezaire et al., 2004), ^{6c}a la PLA2 (Mita et al., 1991, 1990) y al canal de Ca²⁺ CatSper (Seifert et al., 2015). El AMPc abre el canal de Na⁺ SpHCN e induce una entrada de ^{7a}Na⁺ y una despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización activa el canal CatSper e induce oscilaciones de ^{8a}Ca²⁺. El aumento de pH_i estimula la actividad de la CPT-I y aumenta la concentración de los ésteres de carnitina que entran en la mitocondria a través del sistema de la carnitina. La re-esterificación de la acil-carnitina en acil-CoA dentro de la mitocondria (a través de CPT-II) alimenta a la β -oxidación. La ^{7c} β -oxidación y/o el ^{8c}ciclo de Krebs ⁹aumentan los niveles de NADH que transfieren sus electrones a la CTE y que junto con la PLA2 y con el ADP ¹²estimulan el consumo de oxígeno. La CTE consume el NADH para ¹³regenerar el $\Delta\Psi$ utilizado por la ¹⁴F₀F₁-ATP sintasa para la síntesis de ATP. El cual ¹⁵alimenta a la fosfocreatina, que a su vez transfiere el ATP a las dineínas. Finalmente, las ^{6b}dineínas hidrolizan el ATP de manera concertada con las ^{8a}oscilaciones de [Ca²⁺]_i para regular el nado del espermatozoide (^{7b}movilidad y ^{8b}quimiotaxis). MMI: membrana mitocondrial interna; MMO: membrana mitocondrial externa; EIM; espacio intermembranal.

XI. PERSPECTIVAS

1. Examinar los niveles de ATP y ADP en la escala temporal de la respuesta de los espermatozoides a speract, mediante el indicador fluorescente “Magnesium Green” que detecta el complejo ATP-Mg²⁺ o con ensayos enzimáticos como el de la luciferasa que puede identificar ya sea el ATP o el ADP.
2. Evaluar la participación de la mitocondria en la quimiotaxis de los espermatozoides hacia el speract, registrando dicho evento en presencia de inhibidores mitocondriales.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M., Benedetto, G., Magalhães, P., Filippin, L., Pozzan, T., 2004. Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11521–11529.
- Afzelius, B., Mohri, H., 1966. Mitochondria respiring without exogenous substrate: A study of aged sea urchin spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42, 10–17.
- Akhmedov, D., Braun, M., Matakí, C., Park, K.S., Pozzan, T., Schoonjans, K., Rorsman, P., Wollheim, C.B., Wiederkehr, A., 2010. Mitochondrial matrix pH controls oxidative phosphorylation and metabolism-secretion coupling in INS-1E clonal beta cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 4613–4626.
- Alvarez, L., Dai, L., Friedrich, B.M., Kashikar, N.D., Gregor, I., Pascal, R., Kaupp, U.B., 2012. The rate of change in Ca²⁺ concentration controls sperm chemotaxis. *The Journal of Cell Biology* 196, 653–663.
- Alvarez, L., Friedrich, B.M., Gompper, G., Kaupp, U.B., 2014. The computational sperm cell. *Trends in Cell Biology* 24, 198–207.
- Ardón, F., Rodríguez-Miranda, E., Beltrán, C., Hernández-Cruz, A., Darszon, A., 2009. Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca²⁺ in sea urchin sperm. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787, 15–24.
- Baccetti, B., Pallini, V., Burrini, A., 1975. Localization and catalytic properties of lactate dehydrogenase in different sperm models. *Exp. Cell. Res.* 90, 183–190.
- Banchio, C., Gramajo, H.C., 1997. Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a gram-positive bacterial system. *Microbiology* 143, 2439–2447.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., Lenaz, G., 2003. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1606, 137–146.
- Barry, W.H., Horowitz, J.D., Smith, T.W., 1985. Comparison of negative inotropic potency, reversibility, and effects on calcium influx of six calcium channel antagonists in cultured myocardial cells. *British journal of pharmacology* 85, 51–59.
- Beltrán, C., Vacquier, V.D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L.R., Darszon, A., 2007. Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 1128–1135.
- Beltrán, C., Zapata, O., Darszon, A., 1996. Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry* 35, 7591–7598.
- Bezaire, V., Heigenhauser, G.J.F., Spriet, L.L., 2004. Regulation of CPT I activity in intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria from human and rat skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 286, E85–E91.
- Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., Bastin, J., 2004. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 495–520.
- Cardullo, R.A., Herrick, S.B., Peterson, M.J., Dangott, L.J., 1994. Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Developmental biology* 162, 600–607.
- Castellano, L., López-Godínez, J., Aldana, G., Barrios-Rodiles, M., Obregón, A., García de De la Torre, L., Darszon, A., García-Soto, J., 1995. The acrosome reaction in digitonin-permeabilized sea urchin sperm in the absence of the natural inducer. *Eur J Cell Biol.* 23–31.
- Christen, R., Schackmann, R.W., Shapiro, B.M., 1986. Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *J. Physiol.* 379, 347–365.
- Christen, R., Schackmann, R.W., Shapiro, B.M., 1982. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of*

- Biological Chemistry 257, 14881–14890.
- Christen, R., Schackmannfl, R.W., Shapiro, B.M., 1983. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 5392–5399.
- Colbeau, A., Nachbaur, J., Vignais, P., 1971. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 462–492.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B.E., Nishigaki, T., Wood, C.D., 2008. Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol.* 52, 595–606.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Trevino, C.L., 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews* 91, 1305–1355.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Ildiko, S., Rizzuto, R., 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–40.
- Denton, R.M., 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1309–1316.
- Di Lisa, F., Blank, P.S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H.S., Stern, M.D., Hansford, R.G., 1995. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *The Journal of physiology* 486, 1–13.
- Eaton, S., 2002. Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Progress in Lipid Research* 41, 197–239.
- Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M., 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *The Biochemical journal* 320, 345–357.
- Emaus, R.K., Grunwald, R., Lemasters, J.J., 1986. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et biophysica acta* 850, 436–448.
- Eng, J., Lynch, R.M., Balaban, R.S., 1989. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophysical journal* 55, 621–630.
- Ernster, L., Schatz, G., 1981. Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* 91, 227s–255s.
- Foster, K.A., Galeffi, F., Gerich, F.J., Turner, D.A., Müller, M., 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Progress in neurobiology* 79, 136–171.
- Fritz, I.B., Yue, K.T., 1963. Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. *Journal of lipid research* 4, 279–288.
- Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, J.E., Darszon, A., 2000. Participation of a K^+ channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Developmental biology* 221, 285–294.
- García-Soto, J., González-Martínez, M., De la Torre, L., Darszon, A., 1987. Internal pH can regulate Ca^{2+} uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Developmental biology* 120, 112–120.
- Glancy, B., Balaban, R.S., 2012. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 51, 2959–2973.
- González-Martínez, M., Darszon, A., 1987. A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS letters* 218, 247–250.
- Granados-Gonzalez, G., Mendoza-Lujambio, I., Rodriguez, E., Galindo, B.E., Beltrán, C., Darszon, A., 2005. Identification of voltage-dependent Ca^{2+} channels in sea urchin sperm. *FEBS Letters* 579, 6667–6672.
- Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C.D., Corkidi, G., Darszon, A., 2011. Strategies for locating the female gamete: The importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Molecular Human Reproduction* 17, 511–523.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Yoshiro, T., Wood, C.D., Darszon, A., 2010. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology* 344, 52–65.
- Hafner, R.P., Brown, G.C., Brand, M.D., 1990. Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation

- rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the “top-down” approach of metabolic control theory. *European journal of biochemistry / FEBS* 188, 313–319.
- Hagström, B.E., 1956. The effect of removal of the jelly coat on fertilization in sea urchins. *Experimental cell research* 10, 740–743.
- Hansbrough, J.R., Garbers, D.L., 1981. Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. *The Journal of biological chemistry* 256, 2235–2241.
- Hansbrough, J.R., Kopf, G.S., Garbers, D.L., 1980. The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *BBA - General Subjects* 630, 82–91.
- Harumi, T., Hoshino, K., Suzuki, N., 1992. Effects of sperm-activating peptide I on *Hemicentrotus pulcherrimus* spermatozoa in high potassium sea water. *Develop Growth & Differ* 34, 163–172.
- Hirohashi, N., Kamei, N., Kubo, H., Sawada, H., Matsumoto, M., Hoshi, M., 2008. Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Development, growth & differentiation* 50, S221–S238.
- Ho, H.C., Suarez, S.S., 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction* 68, 1590–1596.
- Huang, S., Heikal, A.A., Webb, W.W., 2002. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J.* 82, 2811–2825.
- Jabůrek, M., Ježek, J., Zelenka, J., Ježek, P., 2013. Antioxidant activity by a synergy of redox-sensitive mitochondrial phospholipase A2 and uncoupling protein-2 in lung and spleen. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45, 816–825.
- Ježek, P., Engstová, H., Záčková, M., Vercesi, A.E., Costa, A.D., Arruda, P., Garlid, K.D., 1998. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1365, 319–327.
- Jiang, D., Zhao, L., Clish, C.B., Clapham, D.E., 2013. Letm1, the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2249–E2254.
- Johnson, L., Walsh, M., Bockus, B., Chen, L., 1981. Monitoring of relative mitochondrial-membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology* 88, 526–535.
- Kahlert, S., Zündorf, G., Reiser, G., 2008. Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123. *Journal of neuroscience methods* 171, 87–92.
- Kapus, A., Ligeti, E., Fonyó, A., 1989. Na⁺/H⁺ exchange in mitochondria as monitored by BCECF fluorescence. *FEBS letters* 251, 49–52.
- Kennedy, J.A., Unger, S.A., Horowitz, J.D., 1996. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 in rat heart and liver by perhexiline and amiodarone. *Biochemical Pharmacology* 52, 273–280.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., Clapham, D.E., 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364.
- Koopman, W.J.H., Distelmaier, F., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2013. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO journal* 32, 9–29.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F.N., Saks, V., Margreiter, R., Kunz, W.S., 2008. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols* 3, 965–976.
- Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B., 2008. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundamental & clinical pharmacology* 22, 335–353.
- Lee, H.C., 1985. The voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *The Journal of biological chemistry* 260, 10794–10799.
- Lee, H.C., Garbers, D.L., 1986. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *The Journal of biological chemistry* 261, 16026–16032.
- Lopaschuk, G.D., Belke, D.D., Gamble, J., Itoi, T., Schönekeess, B., 1994. Regulation of fatty acid

- oxidation in the mammalian heart in health and disease 1213, 263–276.
- Mazat, J.P., Ransac, S., Heiske, M., Devin, A., Rigoulet, M., 2013. Mitochondrial energetic metabolism—some general principles. *IUBMB life* 65, 171–179.
- McGarry, J.D., Brown, N.F., 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry / FEBS* 244, 1–14.
- Mita, M., Harumi, T., Suzuki, N., Ueta, N., 1991. Localization and characterization of phosphatidylcholine in sea urchin spermatozoa. *J Biochem.* 242, 238–242.
- Mita, M., Nakamura, M., 1998. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: an approach based on echinoid phylogeny. *Zoological science* 15, 1–10.
- Mita, M., Ueta, N., 1990. Phosphatidylcholine metabolism for energy production in sea urchin spermatozoa. *Biochimica et biophysica acta* 1047, 175–179.
- Mita, M., Ueta, N., Harumi, T., Suzuki, N., 1990. The influence of an egg-associated peptide on energy metabolism in sea-urchin spermatozoa: the peptide stimulates preferential hydrolysis of phosphatidylcholine and oxidation of fatty acid. *Biochimica et biophysica acta* 1035, 175–181.
- Nelson, D., Cox, M., 2005. *Principles of biochemistry*, Fourth. ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- Nicholls, D.G., 1974. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* 50, 305–315.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L., Darszon, A., 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications* 450, 1149–1158.
- Nishigaki, T., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., Darszon, A., 2001. Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 531–535.
- Oyanagi, E., Yano, H., Uchida, M., Utsumi, K., Sasaki, J., 2011. Protective action of L-carnitine on cardiac mitochondrial function and structure against fatty acid stress. *Biochemical and biophysical research communications* 412, 61–67.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 436–441.
- Pichlo, M., Bungert-Plümke, S., Weyand, I., Seifert, R., Bönigk, W., Strünker, T., Kashikar, N.D., Goodwin, N., Müller, A., Pelzer, P., Van, Q., Enderlein, J., Klemm, C., Krause, E., Trötschel, C., Poetsch, A., Kremmer, E., Kaupp, U.B., 2014. High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor. *The Journal of cell biology* 206, 541–557.
- Pomin, V.H., 2015. Sulfated glycans in inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 92, 353–369.
- Quarato, G., Piccoli, C., Scrima, R., Capitanio, N., 2011. Functional imaging of membrane potential at the single mitochondrion level: possible application for diagnosis of human diseases. *Mitochondrion* 11, 764–773.
- Rampe, D., Wang, Z., Fermini, B., Wible, B., Dage, R., Nattel, S., 1995. Voltage- and time-dependent block by perhexiline of K⁺ currents in human atrium and in cells expressing a Kv1.5-type cloned channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 274, 444–449.
- Reers, M., Kelly, R.A., Smith, T.W., 1989. Calcium and proton activities in rat cardiac mitochondria. *Biochemical Journal* 257, 131–142.
- Repaske, D.R., Garbers, D.L., 1983. A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* 258, 6025–6029.
- Reynaud, E., De de La Torre, L., Zapata, O., Liévano, A., Darszon, A., 1993. Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS letters* 329, 210–214.
- Rodríguez, E., Darszon, A., 2003. Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *The Journal of physiology* 546, 89–100.
- Rodríguez-Enríquez, S., Hernández-Esquível, L., Marín-Hernández, A., El Hafidi, M., Gallardo-Pérez,

- J.C., Hernández-Reséndiz, I., Rodríguez-Zavala, J.S., Pacheco-Velázquez, S.C., Moreno-Sánchez, R., 2015. Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 65, 209–221.
- Rothschild, L., 1948. The physiology of sea-urchin spermatozoa; senescence and the dilution effect. *The Journal of experimental biology* 25, 353–368.
- Samartsev, V.N., Marchik, E.I., Shamagulova, L. V., 2011. Free fatty acids as inducers and regulators of uncoupling of oxidative phosphorylation in liver mitochondria with participation of ADP/ATP- and aspartate/glutamate-antiporter. *Biochemistry. Biokhimiia* 76, 217–224.
- Santella, L., Vasilev, F., Chun, J.T., 2012. Fertilization in echinoderms. *Biochemical and biophysical research communications* 425, 588–94. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.159
- Saraste, M., 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science (New York, N.Y.)* 283, 1488–1493. doi:10.1126/science.283.5407.1488
- Schackmann, R.W., Chock, P.B., 1986. Alteration of intracellular $[Ca^{2+}]$ in sea urchin sperm by the egg peptide speract. *Journal of Biological Chemistry* 261, 8719–8728.
- Schackmann, R.W., Christen, R., Shapiro, B.M., 1984. Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13914–13922.
- Schneckenburger, H., Stock, K., Lyttek, M., Strauss, W.S.L., Sailer, R., 2004. Fluorescence lifetime imaging (FLIM) of rhodamine 123 in living cells. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 127–131.
- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N.D., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U.B., Strünker, T., 2015. The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *EMBO J.* 34, 379–393.
- Selby, P.L., Sherratt, H.S., 1989. Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs. *Trends in pharmacological sciences* 10, 495–500.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Chen, L.B., 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3671–3675.
- Smith, J.F., Syritsyna, O., Fellous, M., Serres, C., Mannowetz, N., Kirichok, Y., Lishko, P. V., 2013. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{2+} channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6823–6828.
- Szabadkai, G., Duchen, M.R., 2008. Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling. *Physiology* 23, 84–94.
- Takahashi, A., Zhang, Y., Centonze, V.E., Herman, B., 2001. Measurement of mitochondrial pH in situ. *BioTechniques* 30, 804–815.
- Takeuchi, A., Kim, B., Matsuoka, S., 2013. The mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci Rep* 3, 1–11.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., Balaban, R.S., 2000. Ca^{2+} activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C423–435.
- Toescu, E.C., Verkhratsky, A., 2000. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 440, 941–947.
- Tominaga, H., Katoh, H., Odagiri, K., Takeuchi, Y., Kawashima, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H., Hayashi, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H., Hayashi, H., 2008. Different effects of palmitoyl- L -carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes. *American journal of physiology heart and circulatory physiology.* 295, 105–112.
- Vacquier, V.D., Loza-Huerta, A., García-Rincón, J., Darszon, A., Beltrán, C., 2014. Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842, 2621–2628.

- Walker, B.D., Valenzuela, S.M., Singleton, C.B., Tie, H., Bursill, J. a, Wyse, K.R., Qiu, M.R., Breit, S.N., Campbell, T.J., 1999. Inhibition of HERG channels stably expressed in a mammalian cell line by the antianginal agent perhexiline maleate. *British journal of pharmacology* 127, 243–251.
- Wiedenmann, A., Dimroth, P., von Ballmoos, C., 2008. $\Delta\psi$ and ΔpH are equivalent driving forces for proton transport through isolated F₀ complexes of ATP synthases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1777, 1301–1310.
- Wojtczak, L., Schonfeld, P., 1993. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1183, 41–57.
- Wood, C.D., Darszon, A., Whitaker, M., 2003. Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *The Journal of cell biology* 161, 89–101.
- Wood, C.D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S.A., Darszon, A., 2005. Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *The Journal of cell biology* 169, 725–731.
- Wood, C.D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S.A., Whitaker, M., Darszon, A., 2007. Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental biology* 306, 525–537.
- Wright, B.D., Hinkley, R.E., Greenberg, C.A., 1986. Induction of the acrosome reaction in sea urchin spermatozoa by the volatile anesthetic halothane. *Biology of reproduction* 34, 119–125.
- Wyatt, C.N., Buckler, K.J., 2004. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol* 556, 175–191.
- Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C.H., Ren, D., 2007. CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of reproduction* 77, 551–559.
- Xiong, J.W., Zhu, L., Jiao, X., Liu, S. Sen, 2010. Evidence for ΔpH surface component (ΔpHS) of proton motive force in ATP synthesis of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1800, 213–222.
- Zamzami, N., Maisse, C., Métivier, D., Kroemer, G., 2007. Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods in cell biology* 80, 327–340.
- Zhang, X., Li, L., Zhang, L., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2009. Cyanide-induced death of dopaminergic cells is mediated by uncoupling protein-2 up-regulation and reduced Bcl-2 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 11–19.

XIII. APÉNDICE

13.1. Artículo de Doctorado: **Juan García-Rincón**, Alberto Darszon, Carmen Beltrán, Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. *BBA - Bioenergetics* (2016) 1857: 415-426



Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism



Juan García-Rincón*, Alberto Darszon*, Carmen Beltrán*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos CP. 62210, México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 August 2015
Received in revised form 22 December 2015
Accepted 5 January 2016
Available online 6 January 2016

Keywords:
Intracellular pH
Mitochondrial membrane potential
NADH
Carnitine palmitoyl transferase-I
Speract
Sperm

ABSTRACT

Sea urchin sperm have only one mitochondrion, that in addition to being the main source of energy, may modulate intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) to regulate their motility and possibly the acrosome reaction. Speract is a decapeptide from the outer jelly layer of the *Strongylocentrotus purpuratus* egg that upon binding to its receptor in the sperm, stimulates sperm motility, respiration and ion fluxes, among other physiological events. Altering the sea urchin sperm mitochondrial function with specific inhibitors of this organelle, increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in an external Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$)-dependent manner (Ardón, et al., 2009. *BBA* 1787: 15), suggesting that the mitochondrion is involved in sperm $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeostasis. To further understand the interrelationship between the mitochondrion and the speract responses, we measured mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) and NADH levels. We found that the stimulation of sperm with speract depolarizes the mitochondrion and increases the levels of NADH. Surprisingly, these responses are independent of external Ca^{2+} and are due to the increase in intracellular pH (pH_i) induced by speract. Our findings indicate that speract, by regulating pH_i , in addition to $[\text{Ca}^{2+}]_i$, may finely modulate mitochondrial metabolism to control motility and ensure that sperm reach the egg and fertilize it.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondria are multifunctional organelles deeply involved in cell metabolism [1]. They possess an outer and an inner membrane (IMM) harbouring, amongst many components, complexes I–IV of the electron transport chain (ETC) and the FoF_1 -ATP synthase [2]. The hydrogen donors NADH and FADH₂ transfer their electrons to complex I and II of the ETC respectively [3]. The output of protons (H^+) through complexes I, III and IV at the IMM generates an electrochemical proton gradient comprising the mitochondrial pH gradient ($\Delta\text{pH}_{\text{mit}}$: a pH gradient across the IMM [4]) and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) [4,5].

Abbreviations: ASW, artificial sea water; BCECF-AM, 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, intracellular Ca^{2+} concentration; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; CPT-I, carnitine palmitoyl transferase-I; 0CaASW, is ASW lacking CaCl_2 containing 30 μM EGTA yielding a final extracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) of 110 nM; ΔpH_i , intracellular pH change; $\Delta\Psi$, mitochondrial membrane potential; Em, membrane potential; ETC, electron transport chain; FFA, free fatty acids; IMM, inner mitochondrial membrane; $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$, extracellular K^+ concentration; Rhod-123, Rhodamine 123.

* Corresponding authors at: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Av. Universidad # 2001, Cuernavaca, Morelos, México, CP 62210.

E-mail addresses: darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon), beltran@ibt.unam.mx (C. Beltrán).

Ca^{2+} entry into mitochondria depends on $\Delta\Psi$ [6,7] and alters the activity of the Ca^{2+} -sensitive intramitochondrial dehydrogenases and the FoF_1 -ATP synthase [8,9]. Ca^{2+} fluxes from this organelle, together with those in the endoplasmic reticulum, contribute to the spread and synchronization of Ca^{2+} signals throughout the cytoplasm in many cell types [10–12]. In sperm, which lack endoplasmic reticulum, the intracellular Ca^{2+} signals modulate motility, chemotaxis and acrosome reaction, all essential events required for homologous egg fertilization [13].

The single mitochondrion of sea urchin sperm, located at the base of the head, is important for motility [14], and possibly for Ca^{2+} homeostasis and the acrosome reaction [15]. It is known that sea urchin sperm obtain their energy for swimming from the oxidation of endogenous phospholipids [14,16]. Long-chain fatty acids (LCFA) generated by the hydrolysis of triglycerides are incorporated from the cytosol into the mitochondrial matrix through the carnitine palmitoyltransferase (CPT) shuttle system which consists of CPT-I, acylcarnitine translocase (IMM), and CPT-II (reforms the acyl-CoA moiety in the mitochondrial matrix). The pH-sensitive CPT-I which spans the outer mitochondrial membrane and catalyzes the transfer of long-chain fatty acyl groups, from free coenzyme A (CoASH) to carnitine, is considered the rate-limiting step in the transfer of LCFA into the mitochondria [17–20]. The re-esterified acyl-CoA in the mitochondria (by CPT-II), undergo fatty acid β -oxidation [21] that produces NADH and FADH₂ yield their electrons to the ETC that provides the $\Delta\Psi$ required for the synthesis of

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.01.003>
0005-2728/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

ATP [22]. The pH-sensitive dynein-ATPases at the axoneme (the flagellar motor apparatus), the main ATP-consumers [23], are finely coupled to mitochondrial respiration and pH_i [23,24].

Sperm activating peptides (SAPs) modulate motility in a species-specific manner. Speract was the first SAP isolated from the egg jelly of *Strongylocentrotus purpuratus* [25,26]. Speract binding to its receptor, which is coupled to a guanylyl cyclase (GC) in the sperm flagellum [27], stimulates enzyme activity, increasing the levels of cGMP. The cGMP increase activates the tetra-KCNK K^+ channel, inducing a transient membrane potential (Em) hyperpolarization [28,29]. This hyperpolarization activates, among others, the Na^+/H^+ exchanger and, indirectly, adenylyl cyclase (AC) activity, leading to increases in pH_i and cAMP, respectively [30–32]. The pH_i increase and subsequent Em depolarization elevate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by activating pH-sensitive Ca^{2+} channels [33,34], the main candidate being CatSper, a sperm-specific, mildly voltage and pH_i dependent Ca^{2+} channel [35,36]. High extracellular KCl (40 mM) inhibits this speract-activated signaling cascade, except the cGMP increase [37].

Our group reported that mitochondrial inhibitors cause a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in sea urchin sperm that depends on external Ca^{2+} [15]. As speract induces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations [38,39], it could alter mitochondrial function and this contributes to modulate sperm swimming. To better understand how the mitochondrion impinges on the sperm responses to speract, we examined if this decapeptide affects $\Delta\Psi$, using Rhodamine-123 (Rhod-123) and NADH levels by recording its autofluorescence. Our results indicate that speract induces a mitochondrial depolarization ($\Delta\Psi$ decrease) and increases the levels of NADH.

From our previous findings we expected that the speract-induced decrease in $\Delta\Psi$ and the increase in NADH levels would depend on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes triggered by speract, but to our surprise we discovered that they were independent of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. Since speract induces a pH_i increase that precedes the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation [36,40], we explored if an artificial intracellular alkalization would mimic the effects of speract on the $\Delta\Psi$ and NADH levels. Indeed, we observed that even at nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$, adding 10 mM NH_4Cl to *S. purpuratus* sperm caused a decrease in $\Delta\Psi$ and an increase in the NADH levels. Notably, we also document that exposure of the cells to perhexiline or etomoxir, two inhibitors of CPT-1, partially prevents mitochondrial depolarization and the speract-induced increases in NADH levels.

Taken together, our results suggest that speract, by elevating pH_i increases mitochondrial lipid oxidation and NADH. This increases respiration, ATP production and diminishes $\Delta\Psi$, allowing sperm to regulate their swimming mode in their search for the egg.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Ammonium chloride (NH_4Cl), carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), cinnamic acid, digitonin, etomoxir, gossypol, nigericin, oligomycin, perhexiline, rotenone, sodium octanoate, valinomycin and the rest of the salts were from Sigma. Rhodamine-123 (Rhod-123) and 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM), were purchased from Life Technologies. Except for KCl , NH_4Cl and etomoxir, the reagents were dissolved in anhydrous dimethylsulfoxide (DM), which in our experimental conditions reached a maximum final concentration of 0.125% v/v. All stock solutions were stored at -20°C until use. Artificial seawater (ASW) contains (in mM): 485 NaCl , 10 KCl , 10 CaCl_2 , 26 MgCl_2 , 30 MgSO_4 , 2.5 NaHCO_3 , 10 Hepes, 0.1 EDTA, pH 7.8. The 1CaASW is ASW pH 7.0, containing 1 mM CaCl_2 and 0CaASW is ASW, pH 7.8 lacking CaCl_2 supplemented with 30 μM EGTA, yielding a final $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ of 110 nM (estimated using the software package WinMaxC 2.4 (Stanford University, Chris Patton <http://www.stanford.edu/~cpatton/downloads.htm>)). In all cases the osmolarity was 950–1000 mOsm. *S. purpuratus* sea urchins were obtained from Pamanes S.A. de C.V. (Ensenada, Baja

California, Mexico). Sperm were collected by intracoelomic injection of the sea urchins with 0.5 M KCl , collected and kept on ice as dry sperm until used (within one day).

2.2. Distribution of Rhod-123 in intact sperm

Diluted sperm (1:10 in 1CaASW) were incubated with different concentrations (5, 10 and 20 μM) of the $\Delta\Psi$ fluorescent indicator Rhod-123 at 14°C during 3 h in the dark (similar results were obtained by incubating 30 min). The Rhod-123 distribution in the whole cell was recorded by confocal microscopy (confocal microscope Zeiss, LSM510).

2.3. Fluorometric determinations of $\Delta\Psi$, pH_i and NADH in sperm populations

Sperm population fluorescence measurements were done according to Rodríguez & Darszon [41] (2003). Briefly, diluted sperm (1:10 in 0.25 ml 1CaASW) were incubated at 14°C during 2–3 h in the dark in the presence of 10 μM Rhod-123 (for $\Delta\Psi$; λ_{ex} 497 and λ_{em} 523 nm [42]) or 0.5 μM BCECF-AM (for pH_i ; λ_{ex} dual 438 and 500; λ_{em} 550 nm [40]). The dye remaining in the media was eliminated from the supernatant by centrifugation (1000 g/5 min at 4°C) and the sedimented spermatozoa were resuspended in the original volume of 1CaASW (except when cells were incubated in the absence of fluorophore, which were diluted 1/3) and kept on ice in the dark until used.

Rhodamine 123 (Rhod 123), a cationic fluorescent dye with a bright emission at 523 nm, is quenched as the dye accumulates within mitochondria according to the negative membrane potential across the IMM. Loss of potential will result in loss of dye from the mitochondria into the cytosol, the dye de-quenches with an overall cellular fluorescence increase, while the dye concentration inside mitochondria decreases indicating a mitochondrial depolarization [43,44].

In this work we use the intrinsic fluorescence of reduced pyridine nucleotides as an indicator of the mitochondrial metabolism. Since the spectroscopic properties of NADH and NAD(P)H are very similar [45], when we record the sperm autofluorescence (λ_{ex} 350; λ_{em} 460 nm) we collect fluorescence from both nucleotides. However, since in sea urchin sperm there is no glycolysis [14,46,47] and its energetic metabolism is oxidative [14], the fluorescence signal corresponds mainly to NADH.

Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme that catalyzes the interconversion of pyruvate and lactate with concomitant interconversion of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and NAD^+ , when oxygen is absent or in short supply [48]. Sea urchin sperm depend on mitochondrial lipid metabolism for energy production [16,49], a pathway which does not involve LDH. Indeed, in *Paracentrotus* and *Arbacia*, it has been demonstrated that this is so [50]. In order to show that the NADH increases triggered by speract in *S. purpuratus* sperm are coming from the mitochondria, we determined the levels of NADH induced by speract in the absence and presence of two LDH inhibitors, cinnamic acid and gossypol. For this we pre-incubated sperm with different concentrations (0.1, 1.0 and 10 μM of gossypol or 0.1, 1.0 and 10 mM of cinnamic acid) of these LDH inhibitors. Supplementary Fig. 1 shows that neither of the two inhibitors did significantly affect the sperm response to speract, confirming that the NADH increase triggered by this decapeptide comes mainly from the sperm mitochondrion.

NADH determinations were performed measuring autofluorescence— λ_{ex} 350; λ_{em} 460 nm—[43] in non-labeled spermatozoa obtained as above. In all assays a 10 μl aliquot of the sperm was added to a round cuvette containing 800 μl ASW or 0CaASW at 14°C under constant stirring in a SLM 8000 Aminco spectrofluorometer. After recording 10 s, different concentrations of speract, NH_4Cl , or inhibitors were added for $\Delta\Psi$, pH_i or NADH measurements. Fluorescence data (F) were normalized by the average fluorescence value before the addition of agonists or inhibitors (F_0) and are expressed as $F/F_0 - 1$.

2.4. Statistics

Fluorescence records were acquired with 4.2 Global Works OLIS software and processed with Microsoft Excel, R software v. 3.1.0 [51] and Origin 6.0. The values given in the bar plots are the mean \pm s.e.m. We use the Boltzmann equation to adjust the data in Fig. 2B (Origin 6.0). For statistical evaluations we used the Student's t-test or one-way ANOVA complemented with Tukey's test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Speract depolarizes the sperm mitochondrion

To further understand how the mitochondrion may modulate speract responses, we decided to measure the $\Delta\Psi$ in sperm populations. First, we determined the Rhod-123 concentration that preferentially labels the sperm mitochondrion by exposing cells to 5–20 μM of the fluorophore. Our results show that 5 and 10 μM Rhod-123 mainly labels sperm mitochondria, while higher concentrations of this dye, such as 20 μM , also distribute to the cytoplasm and the acrosome of some cells (Fig. 1A). As expected, the protonophore CCCP (mitochondrial uncoupler) increased the fluorescence of sperm labelled with 5 and 10 μM Rhod-123, indicating a mitochondrial $\Delta\Psi$ decrease, or mitochondrial depolarization (Fig. 1B).

Given that CCCP affects ΔpH_i and $\Delta\Psi$, we wanted to corroborate that in sea urchin sperm Rhod-123, is detecting $\Delta\Psi$. To this end we tested valinomycin, a K^+ ionophore that dissipates $\Delta\Psi$ [52] and nigericin (a H^+/K^+ ionophore exchanger) that collapses the ΔpH_i and only mildly increases $\Delta\Psi$ [53,54]. Fig. 1C shows that, as anticipated, valinomycin depolarized mitochondria, while nigericin caused a very small change in $\Delta\Psi$ it (Fig. 1C), indicating that Rhod-123 is indeed measuring $\Delta\Psi$ in our system.

Based on the above, we selected 10 μM of Rhod-123 to evaluate the $\Delta\Psi$ in sea urchin sperm, which is within the range of concentrations used in several other systems [43,55–58]. Although it was reported that the binding of speract to its receptor activates sperm respiration and motility without altering $\Delta\Psi$, it is important to note that these results were obtained after prolonged sperm incubations (>3 h) [59–61]. It is now known that the speract-induced sperm pH_i , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^+]_i$ changes (among others) occur within seconds [13,41,62]. Considering this, we wondered whether speract causes fast changes in $\Delta\Psi$ in *S. purpuratus* sperm populations. Fig. 2 (A and B) illustrates that speract concentrations ≥ 25 μM decrease $\Delta\Psi$ (mitochondrial depolarization) in seconds and that this depolarization is blocked by increasing extracellular K^+ concentration ($[\text{K}^+]_{\text{ext}}$) from 10 (normal concentration in ASW) to 40 mM. When the tetra-KCNG K^+ channel opens, there is an efflux of K^+ leading to the initial hyperpolarization triggered by speract. Raising $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ inhibits the hyperpolarization and all the speract signalling cascade, with the exception of the cGMP elevation [37]. Since there is not a specific inhibitor for the Tetra-KCNG channel, we

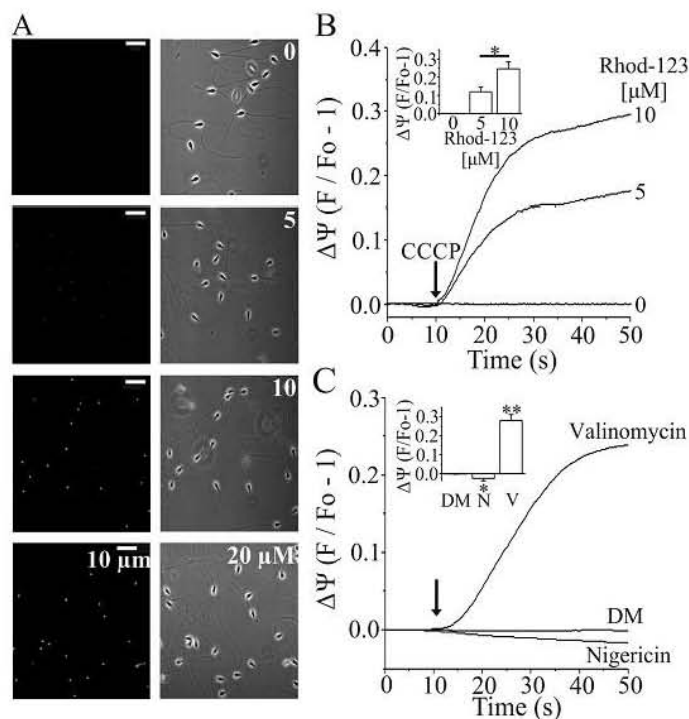


Fig. 1. CCCP decreases sperm $\Delta\Psi$. Sperm (diluted 1:1000 in ASW) were labelled with different concentrations (5, 10 and 20 μM) of Rhod-123, as described in the Methods. Left panels show the Rhod-123 fluorescence distribution in sperm by confocal microscopy, and the right ones, the overlay with the corresponding phase contrast images observed with a 100 \times objective. (B) Representative records of fluorescence changes ($\Delta\Psi$) of sperm loaded with 5 or 10 μM Rhod-123, and treated (arrow) with 1 μM CCCP or (C) sperm loaded with 10 μM Rhod-123, and treated (arrow) with 5 μM valinomycin or 2 μM nigericin. The insets show pooled data of the fluorescence change measured 30 s after the addition of CCCP (B), dimethylsulfoxide (DM) as dissolvent control, valinomycin (V) or nigericin (N) (C). Representative images (A) and records (B, C) from 3 independent experiments. From here on, fluorescence data (F) were normalized by the average fluorescence value before the addition of agonists or inhibitors (F_0) and are expressed as $F/F_0 - 1$. Bars represent the mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

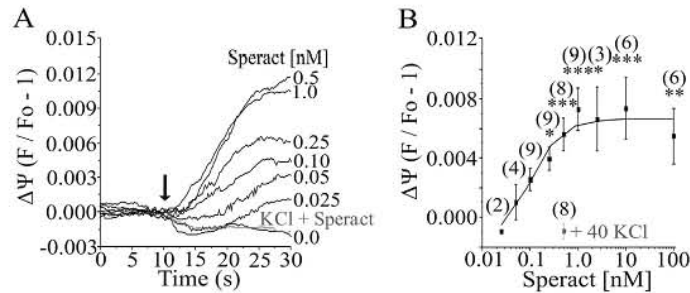


Fig. 2. Speract depolarizes sperm mitochondria. (A) Representative records of $\Delta\Psi$ from sperm stimulated by different speract concentrations (0.025–1 nM) in the absence or presence of 40 mM KCl (0.5 nM speract, grey trace), added 1 min before the peptide. The arrow indicates the speract addition. (B) Summary of experiments performed as in A. The line is the fit of the data to the Boltzmann equation (see Methods). Fluorescence change was measured 7 s after speract addition, the time at which $[Ca^{2+}]_i$ usually reaches its peak. The number of experiments is on top of the error bars. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

use this strategy as a control of the specificity of the sperm responses to speract.

3.2. The speract-induced mitochondrial depolarization is independent of external Ca^{2+}

Since speract causes $[Ca^{2+}]_i$ increases dependent on $[Ca^{2+}]_{ext}$ in sea urchin sperm [39,63,64], it was expected it would influence mitochondria, a matter of consequence to Ca^{2+} cell homeostasis. Considering this, we examined whether the speract-induced sperm mitochondrial depolarization was dependent on $[Ca^{2+}]_{ext}$. Unexpectedly, we found that this peptide was able to decrease $\Delta\Psi$ when artificial seawater (ASW) contained only 110 nM Ca^{2+} (0CaASW; Fig. 3), a condition that eliminates $[Ca^{2+}]_i$ increases [64]. Moreover, the depolarization was larger in 0CaASW than in ASW (Fig. 3B) (see discussion). Controls in high $[K^+]_{ext}$ show the expected response dependence on the initial Em hyperpolarization triggered by speract.

3.3. An artificial pH_i increase depolarizes the sperm mitochondrion

Speract was able to decrease $\Delta\Psi$ in 0CaASW, a condition in which it elevates pH_i [41,64]. Therefore, the mitochondrial depolarization induced by this decapeptide could be due to the pH_i increase. It is known that as speract, an NH_4Cl addition elevates pH_i , increases $[Ca^{2+}]_i$ and activates respiration and motility in *S. purpuratus* sperm [23,34,59,60]. Notably, the activation of respiration and motility have been shown to occur independently of $[Ca^{2+}]_{ext}$ [23,59,61]. As controls,

we corroborated that speract increases pH_i independently of external Ca^{2+} , that this response is inhibited by high $[K^+]_{ext}$ and that, as anticipated, adding NH_4Cl alkalinizes pH_i even in the presence of high $[K^+]_{ext}$ (Fig. 4A and B). In fact, the pH_i increase triggered by speract is greater in 0CaASW.

In agreement with our expectation, we found that NH_4Cl additions induce a $\Delta\Psi$ decrease either in the presence (Fig. 5A and B) or absence of $[Ca^{2+}]_{ext}$ (Fig. 5C and D). In contrast to the speract-induced $\Delta\Psi$ decrease, which is inhibited by high $[K^+]_{ext}$, the NH_4Cl triggered depolarization was not (Fig. 5A inset). These findings, taken together, suggest that it is the increase in pH_i and not the increase in $[Ca^{2+}]_i$ or in cGMP, that is mainly related to the sperm mitochondrial depolarization.

Considering that the speract-induced mitochondrial depolarization is related to the pH_i increase, we also examined how compounds that alter mitochondrial function affect this response. The protonophore CCCP and rotenone (inhibitor of complex I of the ETC) caused an apparent pH_i acidification in sperm (Fig. 6A and B). When mitochondrial ΔpH was eliminated with 2 μM CCCP, the apparent pH_i decrease induced by rotenone was eliminated (Fig. 6B). These findings suggest that in *S. purpuratus* sperm, BCECF is also distributing into the mitochondrion and that the pH changes this organelle undergoes, contribute to the fluorescence changes observed in cell populations.

As expected, oligomycin (a specific inhibitor of the F_0F_1 -ATP synthase) did not alter sperm pH_i (Fig. 6A and B). Pretreatment of sperm with rotenone or oligomycin did not significantly alter the pH_i response induced by speract (Fig. 6C and D); notably, 2 μM CCCP did partially inhibit this response (Fig. 6C and D). This later observation could

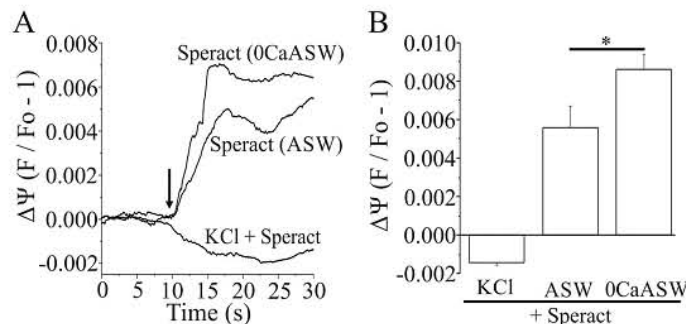


Fig. 3. Speract depolarizes mitochondria of sperm independently of external Ca^{2+} . (A) Representative records of $\Delta\Psi$ from sperm stimulated by 0.5 nM speract in the presence (ASW) or absence (0CaASW) of external Ca^{2+} . High KCl (40 mM) was used as a control for the speract response specificity in ASW, where the arrow indicates the speract addition. (B) Bars represent the summary of experiments performed as in A, evaluating the change in fluorescence 7 s after the addition of speract. Values represent the mean \pm s.e.m. $n = 4-6$; * $p < 0.05$.

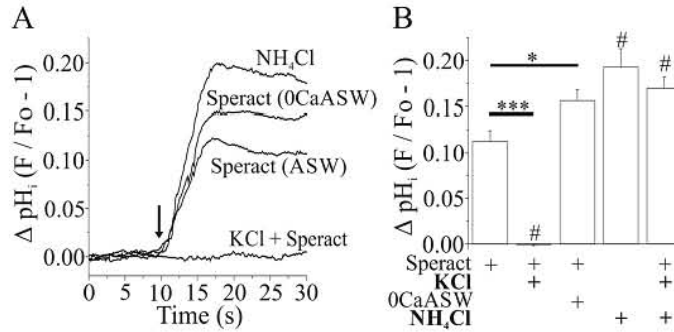


Fig. 4. Speract increases pH_i in sperm independently of external Ca^{2+} . (A) Representative traces of pH_i changes (ΔpH_i) in sperm stimulated by 15 mM NH_4Cl or by 0.5 nM speract in the presence (ASW) or absence (0CaASW) of external Ca^{2+} , or pre-treated with 40 mM KCl, where the arrow indicates the additions. (B) Summary of experiments performed as in A, evaluating the pH_i changes 7 s after additions. Bars represent the mean \pm s.e.m. $n = 4$ –5; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

suggest that speract may also increase the mitochondrial pH . In addition, this finding indicates that the effects caused by rotenone or oligomycin are not related to the speract-induced pH_i response but to their mitochondrial targets.

In order to know if the acidification of the sperm caused by CCCP or rotenone depends on the ATP hydrolysis, we pre-incubated the cells during 3 min with 2 μM oligomycin and then exposed them either to CCCP (2 μM) or rotenone (2 μM). Supplementary Fig. 2 shows that both compounds acidify pH_i independently of the F_0F_1 -ATPase activity.

CCCP, as others protonophores, shuttles H^+ from the intermembrane space back into the mitochondrial matrix. This deviates protons

from the F_0F_1 -ATP synthase, depolarizes mitochondria, which increases the respiration rate, collapses the H^+ gradient across the IMM and thereby uncouples electron transport from ATP synthesis (Reviewed in [43]). Rotenone, which inhibits complex I of the ETC, prevents the utilization of NADH as a substrate and as CCCP, depolarizes the mitochondria reversing the activity of the F_0F_1 -ATP synthase to F_0F_1 -ATPase thereby, increasing the mitochondrial H^+ concentration (i.e., acidifying the pH_i) [65]. Supplementary Fig. 2 shows that CCCP and rotenone also acidify pH_i of sperm permeabilized with 100 μM digitonin, a concentration that maintains mitochondrial functionality in the sperm head (our not shown results; [66]). These results confirm,

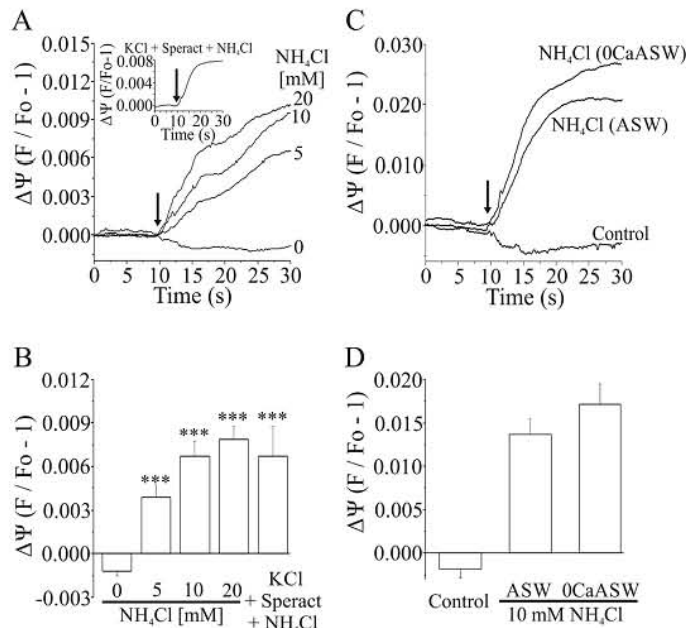


Fig. 5. Artificially increasing sperm pH_i by addition of NH_4Cl depolarizes the sperm mitochondrion even in the absence of external Ca^{2+} . Representative traces of $\Delta\Psi$ in sperm treated with different concentrations (5–20 mM) of NH_4Cl in ASW (A), or with 10 mM NH_4Cl in the presence (ASW) or absence (0CaASW) of external Ca^{2+} (C). (A) The inset shows the response to 10 mM NH_4Cl of sperm pre-exposed to 40 mM KCl + 0.5 nM speract. Control corresponds to the addition ASW as vehicle. Arrows indicate the addition of NH_4Cl or vehicle. (B) and (D) Summary of experiments performed as in A (ASW) or C (0CaASW) respectively, assessing the fluorescence change 7 s after the addition. Bars represent the mean \pm s.e.m. $n = 3$ –6; *** $p < 0.001$.

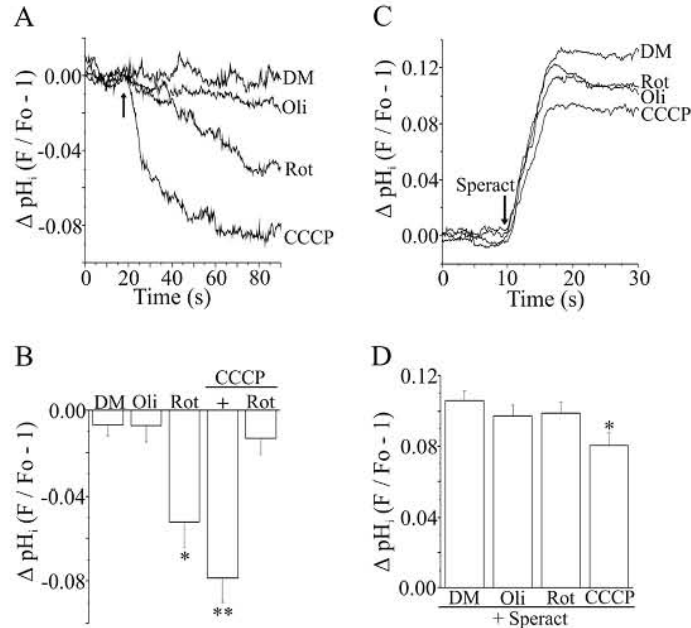


Fig. 6. Rotenone and CCCP cause an apparent acidification. (A) Representative traces of pH_i changes in sperm treated with dimethylsulfoxide (DM, control), 2 μM oligomycin (Oli), 1 μM rotenone (Rot) or 2 μM CCCP, or (C) adding 0.5 nM speract 2 min after the same concentrations of inhibitors. Arrows indicate the additions. (B) and (D) Summary of experiments performed as in A or C, respectively. The pH_i changes were measured 60 s after the inhibitors or CCCP additions, or 7 s after the addition of speract. Bars represent the mean \pm s.e.m. n = 3–5. *p < 0.05, **p < 0.01.

as proposed, that the pH indicator BCECF-AM can enter the sperm mitochondrion and record a pH acidification upon addition of CCCP or rotenone, which is independent of ATP hydrolysis by the FoF₁-ATPase.

3.4. The speract-induced mitochondrial depolarization is partially dependent on FoF₁-ATPsynthase activity

The activation of sperm respiration and motility are also correlated with mitochondrial ATP synthesis [23]. As the mitochondrial ATPase synthesizes ATP, it partially depolarizes mitochondria [67]. To determine whether mitochondrial depolarization induced by speract depends on FoF₁-ATPsynthase activity, sperm were exposed to oligomycin. Fig. 7A and C show that oligomycin hyperpolarizes the sea urchin sperm mitochondria and that the speract-induced depolarization is greater in sperm pre-exposed to oligomycin (Fig. 7B and C). This

observation indicates that FoF₁-ATPsynthase influences the speract-induced mitochondrial depolarization, but that other components of the speract-triggered signalling cascade play a more important role in this event.

3.5. The speract-induced mitochondrial depolarization involves CPT-I activity

In other biological systems, the entry of free fatty acids (FFA) into the mitochondrion uncouples the organelle, stimulates respiration, and decreases its $\Delta\Psi$ [68]. Given that speract depolarizes the mitochondrion of sperm, we wondered if the depolarization could be due to the entrance of acyl-CoAs through the CPT shuttle. To explore this possibility sperm were treated with perhexiline [69] or etomoxir [70], two inhibitors of CPT-I, the enzyme considered the rate-limiting step in the

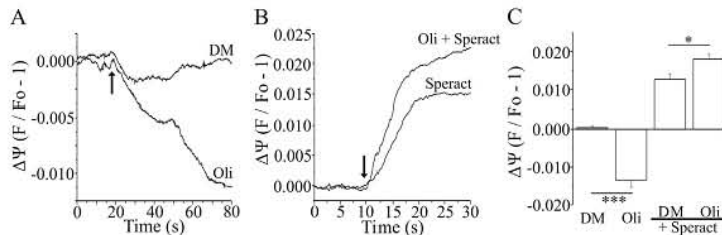


Fig. 7. The mitochondrial depolarization induced by speract is partially dependent on FoF₁-ATPsynthase activity. Representative records of $\Delta\Psi$ from sperm treated with: dimethylsulfoxide (DM) as control, 2 μM oligomycin (Oli) (A), or (B) with 0.5 nM speract added 2 min after treatment, where the arrows indicate the additions. (C) Summary of experiments performed as in A and B. The fluorescence change was measured 60 s after the oligomycin addition, or 7 s after the addition of speract. Bars represent the mean \pm s.e.m. n = 3–5; *p < 0.05; ***p < 0.001.

transfer of LCFA into the mitochondria [17–20]. Etomoxir by itself caused an apparent small mitochondrial depolarization and perhexiline a more significant one (Fig. 8A and B). Possibly perhexiline besides inhibiting the β -oxidation through CPT-I also acts as an uncoupler [71]. Independently of the different apparent depolarization induced by these inhibitors, they both almost eliminated (95 and 80% respectively) the speract $\Delta\Psi$ response (Fig. 8C and D).

Similar results were obtained in spermatozoa by artificially alkalinizing pH_i with NH_4Cl (data not shown). These results suggest that CPT-I is involved in the mitochondrial depolarization induced by speract, confirming that sea urchin sperm get their energy from the oxidation of endogenous lipids [14]. Micromolar concentrations [$> 10 \mu M$] of esterified fatty acids increase oxygen uptake, inducing a slight transient mitochondrial depolarization [72,73], which might be related to an uncoupling effect. This uncoupling effect might also be explained by the increase in FFA concentration caused by the mitochondrial pH -sensitive PLA2 in *S. purpuratus* sperm [14]. In summary, the mitochondrial depolarization might be due to the sum of both, the excessive input of esterified via CPT-I and to the release of non-esterified FFA by PLA2.

3.6. Speract increases the NADH levels in sperm

The levels of NADH provide information about the cell metabolic state. Given that sea urchin sperm mitochondria can incorporate LCFA through the CPT shuttle for its oxidation (via β -oxidation), to generate NADH and FADH₂, we explored if speract alters NADH levels in sperm populations. Fig. 9A and D show that speract increases NADH levels in sperm. As mentioned above, speract diminishes $\Delta\Psi$ (this work) independently of $[Ca^{2+}]_{ext}$. Similarly, speract also increases NADH levels in the absence of $[Ca^{2+}]_{ext}$ (Fig. 9A and D). Accordingly and consistent with our expectation, we found that NH_4Cl additions also induce an increase in NADH levels either in the presence or absence of $[Ca^{2+}]_{ext}$.

(Fig. 9B and D). In contrast to the speract-induced elevation of NADH, which is inhibited by 40 mM KCl, the NH_4Cl -triggered NADH increase was not (Fig. 9D). These findings all together suggest that it is the increase in pH_i that is mainly related to the elevation of the NADH levels and not the increase in $[Ca^{2+}]_i$.

In addition, we examined how the mitochondrial inhibitors rotenone, oligomycin, and the protonophore CCCP, alter the levels of NADH in sea urchin sperm. As anticipated, rotenone and oligomycin increased NADH levels, while CCCP diminished them (Fig. 9C and E). This is in accord with previous reports in bull sperm [74] and in cardiomyocytes [75].

3.7. Speract increases mitochondrial NADH levels oxidizing fatty acids

As speract elevates the levels of NADH in sea urchin sperm, it is possible that the increase is due to the oxidation of FFA. To test this hypothesis, sperm were exposed to the inhibitors of CPT-I, perhexiline and etomoxir, and then stimulated with speract or NH_4Cl to measure NADH levels. Fig. 10A and B show that perhexiline and etomoxir lower the basal levels of NADH in sperm, in a dose-dependent manner. Furthermore, the two inhibitors eliminated the response of spermatozoa to both speract (Fig. 10C–F) and NH_4Cl (inset Fig. 10D and F). These findings indicate that speract increases the levels of NADH due to the alkalisation dependent stimulation of FFA oxidation.

We also observed that exposing the cells sequentially to speract and then to NH_4Cl (not shown), did not cause an additive effect on the levels of NADH. This, together with the fact that treatment of sperm with NH_4Cl increases pH_i (Fig. 4) and NADH levels (Fig. 9 B, D) and that a similar response was obtained when measuring oxygen consumption [60], suggests that the main action of speract on the mitochondrial metabolism is through the increase in pH_i .

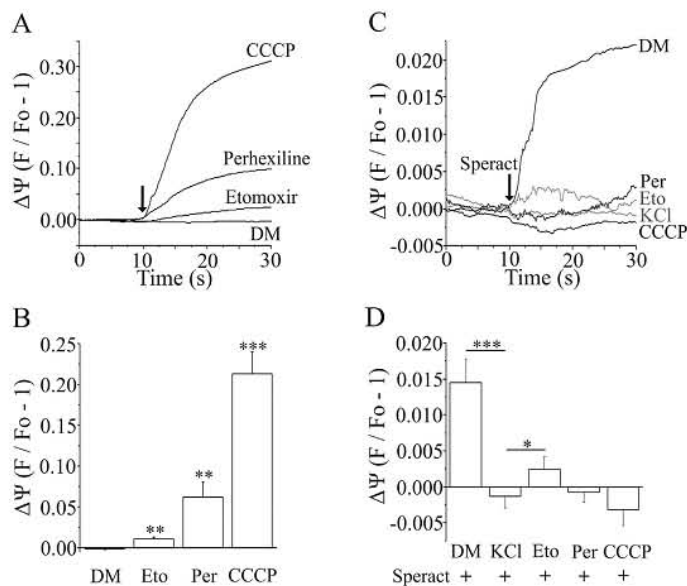


Fig. 8. The mitochondrial depolarization induced by speract is mainly dependent on the CPT-I activity. (A) Representative records of $\Delta\Psi$ from sperm treated with: dimethylsulfoxide (DM, control), 0.5 mM etomoxir, 25 μM perhexiline (Per), 2 μM CCCP or (C) pre-incubating the cells during 2 min (or 1 h in the case of etomoxir) with the same concentrations of inhibitors and then adding 0.5 nM speract. Arrows indicate the additions. (B) and (D) Summary of experiments as in (A) or (C) respectively, assessing the fluorescence change 7 s after the addition. Bars represent the mean \pm s.e.m. n = 4; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

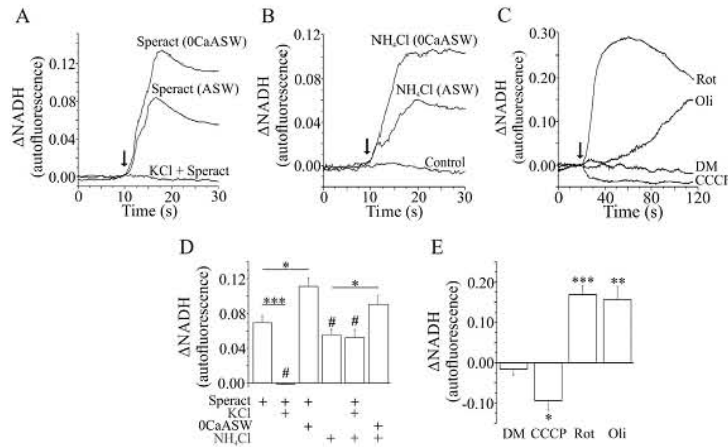


Fig. 9. Speract increases levels of NADH. (A) Representative traces of the change in the NADH autofluorescence in sperm stimulated with 0.5 nM speract, or (B) treated with 15 mM NH_4Cl , either in the presence (ASW) or absence (0CaASW) of external Ca^{2+} , or in the presence of 40 mM KCl (0.5 nM speract), added 1 min before the peptide, or (C) exposed to dimethylsulfoxide (DM, control), 1 μM rotenone (Rot), 2 μM oligomycin (Oli) or 0.1 μM CCCP. (D) and (E) Summary of experiments as in A and B or C respectively, assessing the fluorescence change 7 s after the addition of speract or NH_4Cl , or 100 s after the inhibitors or CCCP additions. Arrows indicate the additions. Bars represent the mean \pm s.e.m. $n = 4-7$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

It has been established that speract regulates *S. purpuratus* sperm swimming [76] and induces chemotaxis in *Lytechinus pictus* sperm by triggering $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes [38,77]. In addition, our group found that mitochondrial inhibitors induced Ca^{2+} uptake dependent on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. [15]. These findings lead us to suspect that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ would be the main link between the mitochondrion and sperm swimming regulation by speract. To better understand the relationship between the speract response and the mitochondrion in sea urchin sperm, we examined how this decapeptide affects the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). We found that speract is able to depolarize the *S. purpuratus* sperm mitochondrion ($\Delta\Psi$ decrease) (Fig. 2). The speract-triggered pH_i increase mediates the *S. purpuratus* stimulation of sperm respiration mainly by H^+ efflux [60]. In agreement with this we observed that the depolarization induced by speract was additive to and became larger when sperm were treated with partially uncoupling concentrations of CCCP ($\leq 0.1 \mu\text{M}$; not shown). To our surprise, this response is independent of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ (Fig. 3).

In *S. purpuratus* sea urchin sperm, speract is able to increase cGMP, opening the tetra-KCNG K^+ channel that hyperpolarizes E_m [28] and activates the Na^+/H^+ exchanger that elevates pH_i independently of the presence of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ [36,41]. Therefore, any of these changes could be responsible for the speract-induced decrease in $\Delta\Psi$. In the presence of high $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$, all steps in the speract signalling cascade are blocked, with the exception of a large elevation in cGMP [37] (see Experimental procedures section). Since the speract-induced mitochondrion depolarization is inhibited by high $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ (Fig. 2), it is likely that the pH_i increase, and not the cGMP elevation induced by this decapeptide, causes the mitochondrial depolarization. This possibility was mentioned early on by Schackmann et al., [61], but was not demonstrated.

We determined that in sea urchin sperm, the increase in pH_i induced by speract is independent of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ and that it is even higher in its absence (Fig. 4). In such a condition, Na^+ uptake through the Na^+/H^+ exchanger would be larger [41], possibly due to a larger E_m hyperpolarization caused by speract. This could explain, at least in part, why the pH_i increase triggered by speract is higher in the absence of Ca^{2+} . Indeed, as shown in Fig. 3, the mitochondrial depolarization induced by speract is also larger in the absence of external Ca^{2+} , which is

consistent with the hypothesis that the pH_i elevation caused by speract leads to mitochondrial depolarization. Our results confirm this hypothesis and show that an NH_4Cl addition, which elevates pH_i (Fig. 4; [34]), depolarizes sperm mitochondria, even in nominal Ca^{2+} (0CaASW) (Fig. 5).

When we evaluated how CCCP affects pH_i in sperm, contrary to what was reported earlier [23], we found that CCCP apparently acidifies the sperm pH_i (Fig. 6). As in rat heart mitochondria [65,78] or intact cells [79,80], CCCP acidifies sperm mitochondrial pH. Furthermore, BCECF-AM also distributes to sea urchin sperm mitochondria (single cell measurements, not shown), accordingly the uncoupler would cause a fluorescence decrease inside this organelle. Such acidification was also observed with rotenone. These results suggest that the observed acidification signal has a mitochondrial component. The fact that 2 μM CCCP eliminates the pH_i acidification induced by rotenone is consistent with the proposal that CCCP and rotenone reduce the mitochondrial pH. On the other hand, exposing sperm to oligomycin did not significantly alter the sperm pH_i , consistent with a previous report [26]. When we evaluated the ΔpH_i induced by speract in sperm pre-exposed to oligomycin or rotenone, no significant effects were found. Notably, collapsing sperm mitochondrial ΔpH with 2 μM CCCP decreases the speract-induced pH_i increase (Fig. 6). Though the uncoupler also affects the plasma membrane, these results suggest that speract may increase both the cytoplasmic and the mitochondrial pH in sea urchin sperm.

The speract-induced pH_i increase stimulates axonemal dynein ATPases that are finely coupled with mitochondrial ATP synthesis to regulate sea urchin sperm motility [23]. Mitochondrial FoF_1 -ATP synthase activation consumes energy from the H^+ electrochemical gradient, depolarizing this organelle [67]. Accordingly, we found that inhibition of the mitochondrial ATPase with oligomycin hyperpolarized the $\Delta\Psi$ and that under the same condition; speract caused a larger mitochondrial depolarization (Fig. 7). This finding suggests that although the FoF_1 -ATP synthase activity modulates the speract induced $\Delta\Psi$ depolarization, it is not the main factor controlling this response and other factors must intervene.

In isolated mitochondria, it has been demonstrated that free fatty acids (FFA) alter mitochondrial function, and that the activation of the pH-sensitive CPT-1 stimulates the β -oxidation [21,81]. According to the above, we found that inhibiting CPT-1 with etomoxir or perhexiline eliminates the speract-induced mitochondrial depolarization (Fig. 8).

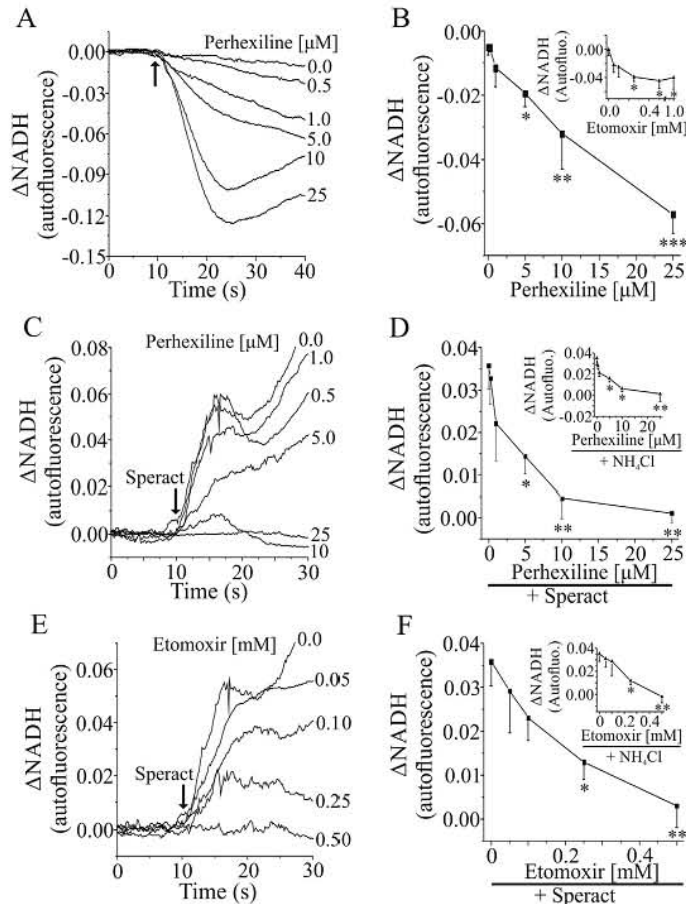


Fig. 10. The mitochondrial increase in NADH induced by speract depends on the activity of CPT-I. (A) Representative traces of the change in the NADH autofluorescence of sperm treated with different concentrations of perhexiline (0.5–25 μM), or (C) adding 0.5 nM speract either 2 min after the same concentrations of perhexiline or (E) 1 h after exposing the cells to different concentrations (0.05–0.5 mM) of etomoxir. (B), (D) and (F) Summary of experiments as in A, C and E respectively, assessing the fluorescence change 7 s after the additions indicated by the arrows. The inserts in (B), (D) and (F) show the summary of the NADH autofluorescence of sperm pre-incubated 1 h with etomoxir (B), or treated with 15 mM NH_4Cl in the presence of perhexiline (D) or etomoxir (F). Bars represent the mean \pm s.e.m. $n = 4$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

This is consistent with the idea that the entrance of FFA into the sperm mitochondria through CPT-shuttle, is the main depolarizing component and that it is regulated by the pH_i elevation induced by speract. This was corroborated by the observation that the mitochondrial depolarization caused by NH_4Cl is also eliminated by the CPT-I inhibitors (not shown).

FFA through the β -oxidation in mitochondria produces NADH and FADH₂. We found that stimulation of sperm with speract increases the NADH levels regardless of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$, and that this response is inhibited by high $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$. It is likely that the pH_i increase is responsible for increasing the levels of NADH. Consistent with the above, artificially alkalinizing sperm with NH_4Cl increases their NADH levels, even in nominal Ca^{2+} (OCaASW) (Fig. 9). Furthermore, we confirmed that inhibition of the ETC with rotenone or of the FoF_1 -ATP synthase with oligomycin increases the levels of NADH while CCCP decreases them.

To establish that the NADH increases triggered by speract were related to the activity of CPT-I, two inhibitors of this enzyme, perhexiline and etomoxir, were tested. Both were found to prevent the increase in NADH induced by speract or NH_4Cl (Fig. 10). It is noteworthy to clarify that perhexiline also inhibits L-type Ca^{2+} channels ($\text{IC}_{50} = 0.83 \mu\text{M}$

[82]) and their functional presence has been reported in sea urchin sperm [83]. Furthermore, this compound also inhibits K^+ -channels such as HERG ($\text{IC}_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ [84]) and Kv1.5 ($\text{IC}_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ [85]), though till now these channels have not been described in sea urchin sperm. Considering the above, we cannot discard the possibility that perhexiline is also affecting channels in our model.

We also observed that exposing sea urchin sperm sequentially to speract and then to NH_4Cl (not shown), did not cause an additive effect on the levels of NADH. This, together with the fact that treatment of sperm with NH_4Cl increases pH_i (Fig. 4) and NADH levels (Figs. 9B, D), and that a similar response was obtained when measuring oxygen consumption [60], suggests that the main action of speract on the mitochondrial metabolism is through the increase in pH_i .

Sea urchin sperm lack glycolysis [14,46,47] and obtain the energy for motility through oxidation of endogenous phospholipids, particularly phosphatidylcholine (PC) which colocalizes with a pH -dependent phospholipase A2 (PLA2) activity in the mitochondrial area [86]. Both fatty acid oxidation and PLA2 activity increase by rising pH_i from 6.5 to 7.5, coincident with motility initiation and activation of respiration [87].

The increase in pH_i triggered by speract might also activate PLA2, increase the FFA concentration partially depolarizing the mitochondria and impairing the electron transport [68] leading to increased NADH levels.

Finally, how do we relate the speract-induced mitochondrial depolarization with the increases in the NADH fluorescence? When sea urchin sperm are diluted in ASW pH 7.8 (basal condition), both respiration

and motility are regulated by pH_i [59]. Under this condition mitochondrial FoF_1 -ATP synthase activity is in equilibrium with the axonemal dynein ATPase activity in the flagella [23,59]. Speract binding to its receptor, increases pH_i , stimulating dynein ATPase activity and sperm respiration to the maximum [23,59,88]. As the activity of dyneins is greater than ATP production, the ATP levels diminish depolarizing the mitochondria [23,59,88]. To contend with energy demand, the pH_i

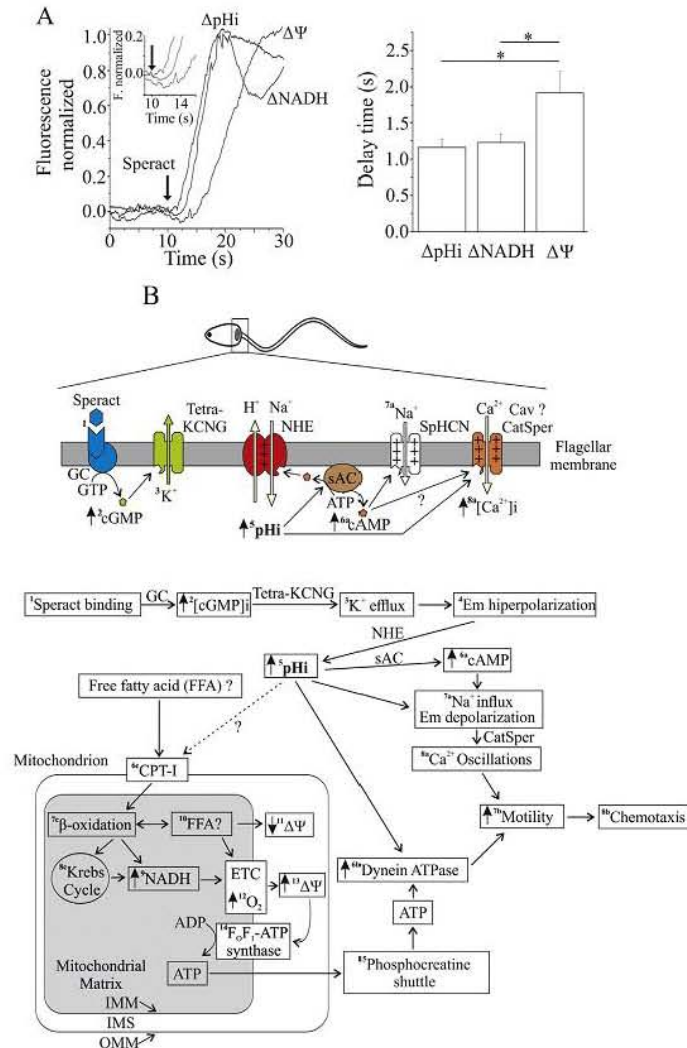


Fig. 11. Proposed model for the activation of the mitochondrial energetic metabolism induced by speract. (A) Representative traces comparing the kinetic changes in pH_i , NADH levels and Ψ of sperm stimulated by speract (right), and summary of their "delay time", from the speract addition indicated by the arrow, to the start point of the increase of pH_i , NADH or $\Delta \Psi$ (left). Bars represent the mean \pm s.e.m. $n = 9-13$, $*p < 0.05$. (B) Binding of speract to its receptor coupled to guanylate cyclase (GC) on the sperm's flagellum elevates $[cGMP]_i$, which opens the tetra-KCNNG K^+ channel, and induces a K^+ efflux and a transient Em hyperpolarization [28,29]. This hyperpolarization activates the Na^+/H^+ exchanger raising pH_i [24,31]. The pH_i increase stimulates: the soluble AC (sAC) elevating $[cAMP]_i$ [32], \uparrow dynein ATPase [23], the $CPT-I$ [81] and the Ca^{2+} channel CatSper [35]. $cAMP$ opens the SpHCN Na^+ channel and induces a Na^+ influx and an Em depolarization. This depolarization activates the channel CatSper inducing Ca^{2+} oscillations. The pH_i increase stimulates $CPT-I$ activity and elevates the concentration of carnitine esters entering the mitochondrion via the carnitine acylcarnitine translocase. Re-esterification of acylcarnitine into acyl-CoA inside mitochondria (via $CPT-II$) fuels β -oxidation. β -oxidation and/or the Krebs cycle increase the levels of NADH that transfer their electrons to the ETC stimulating oxygen consumption. The ETC consumes NADH to generate the $\Delta \Psi$ used by the FoF_1 -ATP synthase for ATP synthesis. This feeds the phosphocreatine shuttle, which in turn transfers the ATP to dyneins. Finally, dyneins hydrolyze ATP in concert with the Ca^{2+} oscillations to regulate sperm swimming (motility and chemotaxis). IMM: inner mitochondrial membrane; OMM: outer mitochondrial membrane; IMS: intermembrane space.

increase triggered by speract stimulates the pH-dependent activities of CPT-I [81] and PLA2 [86,87] to fuel β -oxidation and raise the NADH levels, to restore $\Delta\Psi$ and ATP levels.

Supplementary Fig. 3 shows that octanoate, a FFA that does not use the carnitine shuttle [89], is unable to alter the basal sperm NADH levels nor the increase induced by speract, suggesting that CPT-I is involved in the response it triggers. More experiments are needed to understand how CPT-I participates in the speract signaling cascade.

Our results taken altogether are consistent with the hypothesis that NADH is derived from the oxidation of FFA in mitochondria, which is stimulated by the pH_i elevation caused by speract.

5. Conclusion

Considering the results of this study and those reported previously [13,24,90], our working hypothesis for the involvement of the mitochondrion in the response of the *S. purpuratus* sea urchin sperm to speract is as follows: binding of speract to its receptor on the sperm's flagella elevates cGMP, which opens the tetra-KCNQ K⁺ channel, and induces a transient Em hyperpolarization [28,29,91]. This hyperpolarization activates the Na⁺/H⁺ exchanger, increasing the pH_i [24,31,36], which stimulates the CatSper channel increasing [Ca²⁺]_i [35,36]. Although it was reported that mitochondrial metabolic state influences [Ca²⁺]_i [15], the present work shows that it is the speract triggered increase in pH_i which finely coordinates NADH increases and mitochondrial depolarization (Fig. 11A). The pH_i increase triggered by speract stimulates the pH_i sensitive enzymes CPT-I [81] and PLA2 [86,87] to fuel β -oxidation [17] and increase FFA entry [92] into mitochondria respectively, raising NADH levels that feed the ETC to regenerate $\Delta\Psi$. Both the entry of FFA and the production of their intermediates during β -oxidation lead to the depolarization of the sperm mitochondrion, stimulating oxygen consumption. The ETC consumes NADH to regenerate the $\Delta\Psi$ that the F₀F₁-ATP synthase uses to provide energy to sperm (Fig. 11B). We have corroborated that the sperm pH_i increase induced by NH₄Cl, even in the absence of [Ca²⁺]_{ext.}, mimics the speract response. These findings, taken together, indicate that the pH_i elevation triggered by speract influences mitochondrial $\Delta\Psi$ and NADH levels, which contribute to shape the speract-induced changes that orchestrate sperm swimming.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.01.003>.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

*This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) grants IN202312 to AD and IN204112 to CB, by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant 128566 to AD and by the Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal (SECTI) grant 039/2013 to AD. J. García-Rincón is a PhD student of the Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM program, supported by CONACyT (172443) and DGAPA-UNAM (IN202312 and IN204112). We thank Mr. Antonio Blancas by taking care of the sea urchins.

References

- [1] D.C. Wallace, W. Fan, V. Procaccio, Mitochondrial energetics and therapeutics, *Annu. Rev. Pathol.* 5 (2010) 297–348.
- [2] J.P. Mazat, S. Ransac, M. Heiske, A. Devin, M. Rigoulet, Mitochondrial energetic metabolism—some general principles, *IUBMB Life* 65 (2013) 171–179.
- [3] B. Glancy, R.S. Balaban, Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics, *Biochemistry* 51 (2012) 2959–2973.
- [4] D.G. Nicholls, The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution, *Eur. J. Biochem.* 50 (1974) 305–315.
- [5] A. Holian, D.F. Wilson, Relationship of transmembrane pH and electrical gradients with respiration and adenosine 5'-triphosphate synthesis in mitochondria, *Biochemistry* 19 (1980) 4213–4221.
- [6] Y. Sancak, A.L. Markhard, T. Kitami, E. Kovács-bogdán, K.J. Kamer, N.D. Udeshi, S.A. Carr, D. Chaudhuri, D.E. Clapham, A.A. Li, S.E. Calvo, O. Goldberger, V.K. Mootha, EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science* 342 (2013) 1379–1382.
- [7] Y. Kirichok, G. Kravitskiy, D.E. Clapham, The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel, *Nature* 427 (2004) 360–364.
- [8] R.M. Denton, Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1309–1316.
- [9] P.R. Territo, V.K. Mootha, S.A. French, R.S. Balaban, Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278 (2000) C423–C435.
- [10] D. Jiang, L. Zhao, C.B. Clish, D.E. Clapham, Letm1, the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E2249–E2254.
- [11] A. Takeuchi, B. Kim, S. Matsuoka, The mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1–11.
- [12] G. Szabadkai, M.R. Duchen, Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling, *Physiology* 23 (2008) 84–94.
- [13] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltrán, C.L. Trevino, Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1305–1355.
- [14] M. Mita, M. Nakamura, Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: an approach based on echinoid phylogeny, *Zool. Sci.* 15 (1998) 1–10.
- [15] F. Ardón, E. Rodríguez-Miranda, C. Beltrán, A. Hernández-Cruz, A. Darszon, Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca²⁺ in sea urchin sperm, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 15–24.
- [16] M. Mita, N. Ueta, Phosphatidylcholine metabolism for energy production in sea urchin spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta* 1047 (1990) 175–179.
- [17] S. Eaton, K. Bartlett, M. Pourfarzam, Mammalian mitochondrial beta-oxidation, *Biochem. J.* 320 (1996) 345–357.
- [18] S. Inglis, S. Stewart, Metabolic therapeutics in angina pectoris: history revisited with perhexiline, *Eur. J. Cardiovasc. Nurs.: J. Work. Group Cardiovasc. Nurs. Eur. Soc. Cardiol.* 5 (2006) 175–184.
- [19] J.A. Kennedy, S.A. Unger, J.D. Horowitz, Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 in rat heart and liver by perhexiline and amiodarone, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 273–280.
- [20] J.D. McGarry, N.F. Brown, The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system from concept to molecular analysis, *Eur. J. Biochem./FEBS* 244 (1997) 1–14.
- [21] J.P. Bonnefont, F. Djouadi, C. Prip-Buus, S. Gobin, A. Munnich, J. Bastin, Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects, *Mol. Asp. Med.* 25 (2004) 495–520.
- [22] W.J.H. Koopman, F. Distelmaier, J.A.M. Smeitink, P.H.G.M. Willems, OXPHOS mutations and neurodegeneration, *EMBO J.* 32 (2013) 9–29.
- [23] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Metabolism of sea urchin sperm interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5392–5399.
- [24] T. Nishigaki, O. José, A.L. González-Cota, F. Romero, C.L. Treviño, A. Darszon, Intracellular pH in sperm physiology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450 (2014) 1149–1158.
- [25] N. Suzuki, D.L. Garbers, Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH, *Biol. Reprod.* 30 (1984) 1167–1174.
- [26] J.R. Hansbrough, D.L. Garbers, Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 2235–2241.
- [27] R.A. Cardullo, S.B. Herrick, M.J. Peterson, L.J. Dangott, Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog, *Dev. Biol.* 162 (1994) 600–607.
- [28] B.E. Galindo, C. Beltrán, J.E. Cragoe, A. Darszon, Participation of a K⁺ channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm, *Dev. Biol.* 221 (2000) 285–294.
- [29] H.C. Lee, D.L. Garbers, Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 16026–16032.
- [30] C. Beltrán, O. Zapata, A. Darszon, Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase, *Biochemistry* 35 (1996) 7591–7598.
- [31] H.C. Lee, The voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 10794–10799.
- [32] V.D. Vacquier, A. Loza-Huerta, J. García-Rincón, A. Darszon, C. Beltrán, Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1842 (2014) 2621–2628.
- [33] J. García-Soto, M. González-Martínez, L. De la Torre, A. Darszon, Internal pH can regulate Ca²⁺ uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm, *Dev. Biol.* 120 (1987) 112–120.

- [34] M. González-Martínez, A. Darszon, A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly, *FEBS Lett.* 218 (1987) 247–250.
- [35] R. Seifert, M. Flick, W. Bönigk, L. Alvarez, C. Trötschel, A. Müller, N. Goodwin, P. Pelzer, N.D. Kashikar, J. Jikeli, B. Timmermann, H. Kuhl, D. Fridman, F. Windler, U.B. Kaupp, T. Strücker, The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm, *EMBO J.* 34 (2015) 379–393.
- [36] A.L. González-Cota, P.A. Silva, J. Carneiro, A. Darszon, Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of Ca^{2+} influx in sea urchin spermatozoa, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2146–2154.
- [37] T. Harumi, K. Hoshino, N. Suzuki, Effects of sperm-activating peptide I on *Hemicentrotus pulcherrimus* spermatozoa in high potassium sea water, *Develop. Growth Differ.* 34 (1992) 163–172.
- [38] A. Guerrero, T. Nishigaki, J. Carneiro, T. Yoshiro, C.D. Wood, A. Darszon, Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing, *Dev. Biol.* 344 (2010) 52–65.
- [39] C.D. Wood, A. Darszon, M. Whitaker, Speract induces calcium oscillations in the sperm tail, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 89–101.
- [40] T. Nishigaki, F.Z. Zamudio, L.D. Possani, A. Darszon, Time-resolved sperm responses to an egg peptide mediated by stopped-flow fluorometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2001) 531–535.
- [41] E. Rodríguez, A. Darszon, Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm, *J. Physiol.* 546 (2003) 89–100.
- [42] R.K. Emaus, R. Grunwald, J.J. Lemasters, Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 436–448.
- [43] K.A. Foster, F. Galeffi, F.J. Gerich, D.A. Turner, M. Müller, Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration, *Prog. Neurobiol.* 79 (2006) 136–171.
- [44] N. Zamzami, C. Maisse, D. Méthivier, G. Kroemer, Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria, *Methods Cell Biol.* 80 (2007) 327–340.
- [45] S. Huang, A.A. Heikal, W.W. Webb, Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein, *Biophys. J.* 82 (2002) 2811–2825.
- [46] Rothschild, The physiology of sea-urchin spermatozoa; senescence and the dilution effect, *J. Exp. Biol.* 25 (1948) 353–368.
- [47] J.R. Hansbrough, G.S. Kopf, D.L. Garbers, The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 630 (1980) 82–91.
- [48] D. Nelson, M. Cox, Principles of Biochemistry, 4th ed. W.H. Freeman, New York, USA, 2004.
- [49] B. Afzelius, H. Mohri, Mitochondria respiring without exogenous substrate a study of aged sea urchin spermatozoa, *Exp. Cell Res.* 42 (1966) 10–17.
- [50] B. Baccetti, V. Pallini, A. Burrini, Localization and catalytic properties of lactate dehydrogenase in different sperm models, *Exp. Cell Res.* 90 (1975) 183–190.
- [51] R core Team, A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria (<http://www.r-project.org/>) 2014.
- [52] L. Johnson, M. Walsh, B. Bockus, L. Chen, Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy, *J. Cell Biol.* 88 (1981) 526–535.
- [53] S.T. Smiley, M. Reers, C. Mottola-Hartshorn, M. Lin, A. Chen, T.W. Smith, G.D. Steele, L.B. Chen, Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a β -aggregate-forming lipophilic cation JC-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 3671–3675.
- [54] D. Akhmedov, M. Braun, C. Matak, K.S. Park, T. Pozzan, K. Schoonjans, P. Rorsman, C.B. Wolheim, A. Wiederkehr, Mitochondrial matrix pH controls oxidative phosphorylation and metabolism-secretion coupling in INS-1E clonal beta cells, *FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24 (2010) 4613–4626.
- [55] S. Kahlert, G. Zündorf, G. Reiser, Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123, *J. Neurosci. Methods* 171 (2008) 87–92.
- [56] H. Schneckenburger, K. Stock, M. Lyttek, W.S.L. Strauss, R. Sailer, Fluorescence lifetime imaging (FLIM) of rhodamine 123 in living cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 127–131.
- [57] C.N. Wyatt, The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells, *J. Physiol.* 556 (2003) 175–191.
- [58] E.C. Toescu, A. Verkhratsky, Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 440 (2000) 941–947.
- [59] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14881–14890.
- [60] D.R. Repaske, D.L. Garbers, A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6025–6029.
- [61] R.W. Schackmann, R. Christen, B.M. Shapiro, Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13914–13922.
- [62] C. Beltrán, E. Rodríguez-Miranda, G. Granados-González, L. García de la Torre, T. Nishigaki, A. Darszon, Zn²⁺ induces hyperpolarization by activation of a K⁺ channel and increases intracellular Ca²⁺ and pH in sea urchin spermatozoa, *Dev. Biol.* 394 (2014) 15–23.
- [63] C.D. Wood, T. Nishigaki, Y. Tatsu, N. Yumoto, S.A. Baba, M. Whitaker, A. Darszon, Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility, *Dev. Biol.* 306 (2007) 525–537.
- [64] R.W. Schackmann, P.B. Chock, Alteration of intracellular [Ca²⁺] in sea urchin sperm by the egg peptide speract, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 8719–8728.
- [65] M. Reers, R.A. Kelly, T.W. Smith, Calcium and proton activities in rat cardiac mitochondria, *Biochem. J.* 257 (1989) 131–142.
- [66] L. Castellano, J. López-Godínez, G. Aldana, M. Barrios-Rodiles, A. Obregón, L. García de la Torre, A. Darszon, J. García-Soto, The acrosome reaction in digitonin-permeabilized sea urchin sperm in the absence of the natural inducer, *Eur. J. Cell Biol.* 23–31 (1995).
- [67] A. Baracca, G. Sgarbi, G. Solaini, G. Lenaz, Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through FO during ATP synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1606 (2003) 137–146.
- [68] L. Wojtczak, P. Schonfeld, Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1183 (1993) 41–57.
- [69] S. Rodríguez-Enriquez, L. Hernández-Esquivel, A. Marín-Hernández, M. El Hafidi, J.C. Gallardo-Pérez, I. Hernández-Reséndiz, J.S. Rodríguez-Zavala, S.C. Pacheco-Velázquez, R. Moreno-Sánchez, Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65 (2015) 209–221.
- [70] P.L. Selby, H.S. Sherratt, Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs, *Trends Pharmacol. Sci.* 10 (1989) 495–500.
- [71] G. Labbe, D. Pessayre, B. Fromenty, Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies, *22 (2008) 335–353.*
- [72] E. Oyanagi, H. Yano, M. Uchida, K. Utsumi, J. Sasaki, Protective action of L-carnitine on cardiac mitochondrial function and structure against fatty acid stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 61–67.
- [73] H. Tomimaga, H. Katoh, K. Odagiri, Y. Takeuchi, H. Kawashima, M. Saotome, T. Urushida, H. Satoh, H. Hayashi, M. Saotome, T. Urushida, H. Satoh, H. Hayashi, Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (2008) 105–112.
- [74] H.C. Ho, S.S. Suarez, Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility, *Biol. Reprod.* 68 (2003) 1590–1596.
- [75] J. Eng, R.M. Lynch, R.S. Balaban, Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes, *Biophys. J.* 55 (1989) 621–630.
- [76] C.D. Wood, T. Nishigaki, T. Furuta, S.A. Baba, A. Darszon, Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 725–731.
- [77] A. Guerrero, J. Espinal, C.D. Wood, J.M. Rendón, J. Carneiro, G. Martínez-Mekler, A. Darszon, Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 1477–1487.
- [78] A. Kapus, E. Ligeti, A. Fonyó, Na⁺/H⁺ exchange in mitochondria as monitored by BCECF fluorescence, *FEBS Lett.* 251 (1989) 49–52.
- [79] M. Abad, G. Benedetto, P. Magalhães, L. Filippin, T. Pozzan, Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11521–11529.
- [80] A. Takahashi, Y. Zhang, V.E. Centonze, B. Herman, Measurement of mitochondrial pH in situ, *Biotechniques* 30 (2001) 804–815.
- [81] V. Bezaire, G.J.F. Heigenhauser, L.L. Spriet, Regulation of CPT I activity in intermyofibrillar and subsarcolemmal mitochondria from human and rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286 (2004) E85–E91.
- [82] W.H. Barry, J.D. Horowitz, T.W. Smith, Comparison of negative inotropic potency, reversibility, and effects on calcium influx of six calcium channel antagonists in cultured myocardial cells, *Br. J. Pharmacol.* 85 (1985) 51–59.
- [83] G. Granados-González, I. Mendoza-Lujambio, E. Rodríguez, B.E. Galindo, C. Beltrán, A. Darszon, Identification of voltage-dependent Ca²⁺ channels in sea urchin sperm, *FEBS Lett.* 579 (2005) 6667–6672.
- [84] B.D. Walker, S.M. Valenzuela, C.B. Singleton, H. Tie, J.A. Bursill, K.R. Wyse, M.R. Qiu, S.N. Breit, T.J. Campbell, Inhibition of HERG channels stably expressed in a mammalian cell line by the antianginal agent perhexiline maleate, *Br. J. Pharmacol.* 127 (1999) 243–251.
- [85] D. Rampe, Z. Wang, B. Fermi, B. Wible, R. Dage, S. Nattel, Voltage- and time-dependent block by perhexiline of K⁺ currents in human atrium and in cells expressing a Kv15-type cloned channel, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274 (1995) 444–449.
- [86] M. Mita, T. Harumi, N. Suzuki, N. Ueta, Localization and characterization of phosphatidylcholine in sea urchin spermatozoa, *J. Biochem.* 242 (1991) 238–242.
- [87] M. Mita, N. Ueta, T. Harumi, N. Suzuki, The influence of an egg-associated peptide on energy metabolism in sea-urchin spermatozoa: the peptide stimulates preferential hydrolysis of phosphatidylcholine and oxidation of fatty acid, *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 175–181.
- [88] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity, *J. Physiol.* 379 (1986) 347–365.
- [89] I.B. Fritz, K.T. Yue, Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine, *J. Lipid Res.* 4 (1963) 279–288.
- [90] L. Alvarez, B.M. Friedrich, G. Gompper, U.B. Kaupp, The computational sperm cell, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 198–207.
- [91] D.F. Babcock, M.M. Bosma, D.E. Battaglia, A. Darszon, Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 6001–6005.
- [92] P. Jezek, H. Engstová, M. Záčková, A. Vercesi, A. Costa, P. Arruda, K.D. Garlid, Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1365 (1998) 319–327.