

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales
y de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Transferencia directa de Canales Iónicos
del Espermatozoide de Ratón a bicapas
Lipídicas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

M. V. Z. Eduardo Torres Pérez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuernavaca, Morelos

Septiembre 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi esposa: Martha Alicia por compartir la vida conmigo, siempre apoyándome y confiando en mí.

A nuestros tres angelitos: Edali Anel, Eduardo y Elsie Guadalupe, por el tiempo que les robé y por ser mi mayor estímulo para seguir adelante.

A mi madre: Guadalupe por sus bendiciones y por que siempre ha estado conmigo.

A mi padre: Por los valores que me ha enseñado. A ambos por ponerme en este mundo.

A mis hermanos: Gildardo, Felicitas, Feliciano, Hildebrando, Jesús Salvador, Fanito, Jorge Antonio y Almita, por que siempre me han apoyado y han sido un ejemplo a seguir.

A mis sobrinos: Espero que este esfuerzo sirva para estimularlos a superar a sus tíos.

A la familia Hernández Hernández : Por su cariño y por tratarme como un hijo más.

A mis compañeros y amigos: Por su amistad incondicional.

A ti por llenar mi vida de tantas cosas buenas sin merecerlo. Gracias por indicarme el camino y dejarme sentir tu presencia en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Darazon Israel , por permitirme trabajar en su grupo de investigación, por haber contribuido en gran medida para lo que significó las bases de mi formación científica. Alberto gracias por todo su apoyo.

Al Dr. Arturo Liévano Mendoza, por su amistad y por enseñarme a "lidar con las bicapas". ¡Ánimo amigo!

A la Dra. Carmen Beltrán, por sus consejos . Carmen estamos contigo.

A los miembros de mi comité Totoral: Dr. Omar Pantoja, Dr. Lourival D. Possani y Dr Froylán Lagunas, por sus valiosos comentarios.

A los miembros del jurado: Dra. Alejandra Bravo, Dra. Georgina Gurrola, Dr. Luis Vaca y Dr. Jean L. Charli, por sus oportunas correcciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A todos mis compañeros en el laboratorio: Blanca E. Galindo, Angelina Ramírez, Otilia Zapata, Esmeralda Rodríguez, Felipe Espinosa, Daniel Sánchez, Carmen J. Serrano, Ignacio López, José L. De La Vega, Carlos Garay, Yolanda Sandoval y Claudia Treviño. Gracias a todos por su amistad y consejos.

A todo el personal de apoyo en el laboratorio: Sra. Francisca Candelario, Sr. Juan Monroy, Sra. Rocío Arista y Srita. Antonia Gama, por su apoyo oportuno.

A la Psicóloga Lourdes Chávez Chávez, por su valioso apoyo que me facilitó la conclusión de esta tesis.

Esta tesis se realizó bajo la dirección y en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon Israel, en el departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Agradezco el apoyo económico que durante todo el proyecto recibí por parte del CONACyT, DGAPA - UNAM, y en la última etapa de la UAEM.

LISTA DE ABREVIATURAS

RA	Reacción acrosomal
ZP	Zona Pelúcida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP_c	Monofosfato de Adenosina cíclico
GMP_c	Monofosfato de Guanosina cíclico
E_i	Potencial de equilibrio de un ion
E_m	Potencial de membrana
[K⁺]	Concentración de potasio u otro ion
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de Ca²⁺ u otro ion
pH_i	pH intracelular
IP₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
RIP³	Receptor de IP₃
RMN	Resonancia magnética nuclear
mV	Milivolts
pS	Picosiemens
I	Corriente
A	Amperio
pA	Picoamperios
V	Voltaje
G	Conductancia macroscópica
R	Resistencia
g	Conductancia unitaria
C	Capacitancia
pF	Picofaradios
I/V	Corriente contra Voltaje
P_o	Probabilidad de apertura
RR	Rojo de Rutenio
PVP	Polivinilpirrolidona

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.-

FIGURA	TITULO	PÁGINA
FIG 1	ESQUEMA DE LOS GAMETOS DE MAMÍFERO	3
FIG 2	DIAGRAMA DE LA RA	10
FIG 3	MODELO HIPOTÉTICO DE UN CANAL IÓNICO	23
FIG 4	FORMACIÓN DE LA BICAPA	33
FIG 5	DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA	35
FIG 6	SISTEMA DE PERFUSIÓN	38
FIG 7	FÓRMULA Y DIAGRAMA DEL A23187	39
FIG 8	REGISTRO BICAPA Y TRES TRANSICIONES	43
FIG 9	EFFECTIVIDAD DE LA INCORPORACIÓN	45
TABLA I	CANALES REGISTRADOS	47
FIG 10	REGISTROS DE CANAL DE Ca^{2+} DE ALTA γ	48
FIG 11	CURVA I/V I PRINCIPAL Y SUBESTADOS	49
FIG 12	HISTOGRAMAS DE AMPLITUD DEL CANAL DE Ca^{2+}	50
FIG 13	P_o DEL ESTADO DE MAYOR CONDUCTANCIA	51
FIG 14	REGISTROS DEL CANAL CATIONICO DE ALTA γ	53
FIG 15	CURVA I/V CONDUCTANCIA MAYOR	54
FIG 16	CURVA I/V DE LOS SUBESTADOS	55
FIG 17	REGISTROS DEL BLOQUEO POR RR	57
FIG 18	HISTOGRAMAS DE LOS REGISTROS ANTERIORES	58
FIG 19	GRÁFICA DE I/I_o DEL BLOQUEO POR RR	59
FIG 20	REGISTROS DEL CANAL DE 96 pS	60
FIG 21	CURVA I/V DEL CANAL ANTERIOR	61
FIG 22	REGISTROS DE LA TRANSICIÓN DE 33 pS	63
FIG 23	CURVA I/V DE LOS REGISTROS ANTERIORES	64
FIG 24	REGISTROS DEL CANAL DE 21 pS	65
FIG 25	CURVA I/V Y P_o DEL CANAL ANTERIOR	66

CONTENIDO

RESUMEN

i

I.- INTRODUCCIÓN:	
I.1.- LOS GAMETOS	1
a).- El espermatozoide	1
a.1).- Capacitación	6
a.2).- Acrosoma y RA	8
b).- El óvulo	12
I.2.- FUSIÓN DEL ÓVULO CON EL ESPERMATOZOIDE	16
I.3.- MOLÉCULAS DEL ESPERMATOZOIDE INVOLUCRADAS EN LA UNIÓN Y FUSIÓN:	18
a).- PH30	18
b).- DE	18
c).- M29 y M37	18
d).- OBF13	18
e).- MH61	19
I.4.- MOLÉCULAS DEL ÓVULO INVOLUCRADAS EN LA FUSIÓN	19
I.5.- FUSIÓN DE MEMBRANAS	20
a).- Acoplamiento y contacto íntimo	20
b).- Poros de fusión	20
I.6.- CANALES IÓNICOS	22
II.- ANTECEDENTES	25
III.- OBJETIVOS	29
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	
IV.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	30
a).- Ventajas del uso del Percoll para centrifugar con gradientes de densidad	31
IV.2.- PREPARACIÓN DE LA CÁMARA Y DEL MATERIAL DE VIDRIO UTILIZADO	31
IV.3.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	31
IV.4.- PRETRATAMIENTO DE LA CÁMARA	32
IV.5.- PREPARACIÓN DE BICAPAS	32
IV.6.- ELABORACIÓN DE PUENTES DE AGAR	36
IV.7.- PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS	36
IV.8.- TIPOS DE SOLUCIONES UTILIZADAS	37
IV.9.- SISTEMA DE PERFUSIÓN	37
IV.10.- CUANTIFICACIÓN DE LA RA (Tinción de Coomassie)	38
IV.11.- ESTUDIO DE LOS CANALES INCORPORADOS	39
a) Selectividad	40
b) conductancia	40

V.- RESULTADOS:	
V.1.- REACCIÓN ACROSOMAL	42
V.2.- EXPERIMENTOS CON BICAPAS	42
V.3.- TIPOS DE CANALES INCORPORADOS	46
a).- Canal de Ca²⁺ de alta conductancia	46
b).- Canal catiónico de alta conductancia	52
b.1).- Efecto del RR sobre el canal de alta conductancia anterior	52
c).- Canal catiónico de 96 pS	56
e).- Transición catiónica de 33 pS	62
d).- Canal catiónico de 21 pS	62
VI.- DISCUSIÓN	67
VII.- CONCLUSIONES	74
IX.- BIBLIOGRAFÍA	75

Parte de los resultados de esta tesis se publicaron en las siguientes memorias de Congreso:

1.- Torres Pérez E., Liévano A. y Darszon, A.: Transferencia directa de canales iónicos funcionales del espermatozoide de ratón a bicapas lipídicas. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Manzanillo Col. México. p. 45 inicial y final. Noviembre del 1996.

2.- A. Liévano, E.Torres Pérez, K Ohlendieck, W. Lennarz, y A. Darszon.: Transfer of ion channels from sperm to planar bilayers. III Congreso Iberoamericano de Biofísica, Buenos Aires Argentina. En prensa. Septiembre de 1997.

RESUMEN

La fusión de membranas es un fenómeno fisiológico de gran importancia en la naturaleza. Este fenómeno ocurre tanto dentro de la célula a diferentes niveles, como entre células. Ejemplos de lo anterior son : la liberación sináptica de neurotransmisores, la exocitosis de enzimas digestivas, la reacción acrosomal (RA) del espermatozoide, así como la fecundación.

En este trabajo continuamos el estudio de la transferencia de canales iónicos a bicapas lipídicas planas, directamente de espermatozoides completos de ratón, (69). Esta estrategia experimental nos permitió estudiar algunos de los factores que se requieren para que el espermatozoide se fusione a una bicapa lipídica, e identificar algunos de sus canales iónicos.

Se probaron espermatozoides en condiciones de alta, media, baja y muy baja RA, ($78 \pm 9\%$) $n = 47$, ($46 \pm 6\%$), $n = 13$, ($26 \pm 5\%$), $n = 19$ y ($14 \pm 4\%$) $n = 6$ respectivamente. La RA se indujo con $15 \mu\text{M}$ del ionóforo de Ca^{2+} A23187, y se realizaron los controles apropiados con el ionóforo.

Para la incorporación eficiente de canales es determinante que los espermatozoides: 1) hayan experimentado la RA, 2) estén a una concentración $1-3 \times 10^6$ células por ml, y en menor medida 3) que tengan una movilidad $> 12\%$. Se consiguió el 91 % de efectividad en la incorporación de canales de los espermatozoides con alta RA, el 75 % en los de media, el 44 % en los de baja y sólo el 17% en los de muy baja RA. La transferencia se obtuvo dentro de los primeros 60 min después de haber iniciado el experimento, pasando este tiempo ya no hubo incorporación.

Durante los experimentos se logró la incorporación principalmente de canales catiónicos con pobre selectividad entre cationes monovalentes y un canal de Ca^{2+} de conductancia alta (333 pS) pobremente selectivo. Este último es voltaje dependiente y presenta por lo menos 5 subestados a voltajes negativos. Se abre rápidamente y se va relajando hacia los subestados de menor conductancia, $n = 2$. Se detectó un canal catiónico de alta conductancia (164 ± 10 pS), con por lo menos 3 subestados que se bloqueó parcialmente con $60 \mu\text{M}$ de RR en el lado *trans* de la bicapa, $n = 3$. Los canales no selectivos para cationes monovalentes fueron de 96 ± 5 pS, $n = 3$; 33 ± 1 pS, $n = 3$; y 21 pS, $n = 2$.

I.- INTRODUCCIÓN :

La fecundación es un proceso fascinante de reproducción universal, y ocurre en organismos filogenéticamente muy distantes, tanto en equinodermos como en mamíferos. Es muy probable que la fecundación sea uno de los eventos de fusión celular más dramáticos en la naturaleza (4). Para poder fecundar al óvulo, el espermatozoide de mamífero debe experimentar algunos eventos previos como son: la capacitación (cambios en el metabolismo y en la composición lipídica y protéica de la membrana); y la reacción acrosomal (RA) (fusión de la membrana acrosomal externa con la plasmática (4, 5, 6 y 20). Estos eventos clave para la fecundación se tratarán más a fondo posteriormente.

Existen eventos de transducción de señales entre los gametos en los que los canales iónicos tienen un papel clave. Es importante comprender los mecanismos mediante los cuales ligandos del óvulo orquestan y regulan a los canales iónicos del espermatozoide alterando su movilidad y produciendo la RA.

En humanos la causa más frecuente de infertilidad se atribuye a un mal funcionamiento del espermatozoide. El conocimiento de los canales iónicos de esta célula podría ayudar a resolver algunos de estos problemas. Por otro lado también podría generar mejores estrategias anticonceptivas.

La fecundación en mamíferos es aún un campo abierto a la investigación. Lo anterior se debe en parte a que es difícil reproducir "in vitro", las condiciones fisiológicas internas del tracto genital femenino. Además, algunos mecanismos previos a la fecundación no se conocen bien (i.e.: la capacitación). Por otro lado el espermatozoide es pequeño, de forma elongada, con una cabeza de alrededor de 1-5 μm de diámetro, según la especie, lo que hace difícil su caracterización electrofisiológica.

I.1).- LOS GAMETOS:

a).- El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final de la gametogénesis en el macho. Es una célula muy especializada cuya función es encontrar al óvulo para fusionarse y depositar ahí su información genética. La espermatogénesis ocurre dentro de los túbulos seminíferos del testículo

y consiste en varias divisiones mitóticas de las células tallo (espermatogonias); y dos divisiones meióticas de los espermatocitos (13 y 40).

El espermatozoide de mamífero está formado por la cabeza y la cola o flagelo. (Fig 1-B).

La cabeza contiene al acrosoma, el núcleo, estructuras del citoesqueleto y el citoplasma. El acrosoma es un gránulo secretorio que rodea estrechamente y cubre el extremo anterior del núcleo. El volumen del núcleo del espermatozoide es menor que en las células somáticas, y su cromatina está altamente compactada. Las dos divisiones meióticas que ocurren durante la espermatogénesis producen un genoma haploide, con sólo un miembro de cada par de cromosomas. Las principales proteínas nucleares asociadas con el ADN son protaminas; éstas son relativamente pequeñas (27-65 amino ácidos), altamente básicas, y ricas en arginina y cisteína. La mayoría de mamíferos tiene solo una protamina, pero en ratones y humanos está reportado que tienen dos (1).

La cola contiene un axonema centralmente colocado, el cual es un complejo altamente ordenado de microtúbulos. El orden de los microtúbulos es el mismo que se puede encontrar en otros tipos de células, consistiendo de nueve pares de microtúbulos externos rodeando un par de microtúbulos interno. Toda la estructura de microtúbulos está rodeada de fibras densas extendiéndose desde la cabeza hasta cerca del extremo posterior del axonema. Además, la parte anterior del flagelo contiene la mitocondria envuelta en una estrecha hélice alrededor de las fibras densas. La parte más posterior de la cola contiene la vaina fibrosa rodeando las fibras densas; éstas dos últimas estructuras forman el citoesqueleto del flagelo (13).

Todos los espermatozoides de mamífero tienen estas características generales, sin embargo hay diferencias especie-específicas en tamaño y forma de la cabeza y en la longitud y tamaño de los componentes del flagelo.

Mientras que el acrosoma contiene enzimas esenciales para la fecundación, el flagelo contiene la fuente de energía y maquinaria necesaria para la movilidad del espermatozoide. Esta célula adquiere progresivamente la capacidad de moverse durante la maduración epididimal (13 y 20). Los espermatozoides de la cola del epidídimo son inmóviles en el fluido epididimal, no es hasta que son diluidos en medio fisiológico que pueden empezar a moverse. Una variedad de factores participan en la iniciación y regulación de la movilidad del espermatozoide, sin embargo aún no es claro cómo interactúan estos factores. Generalmente se acepta que la movilidad del

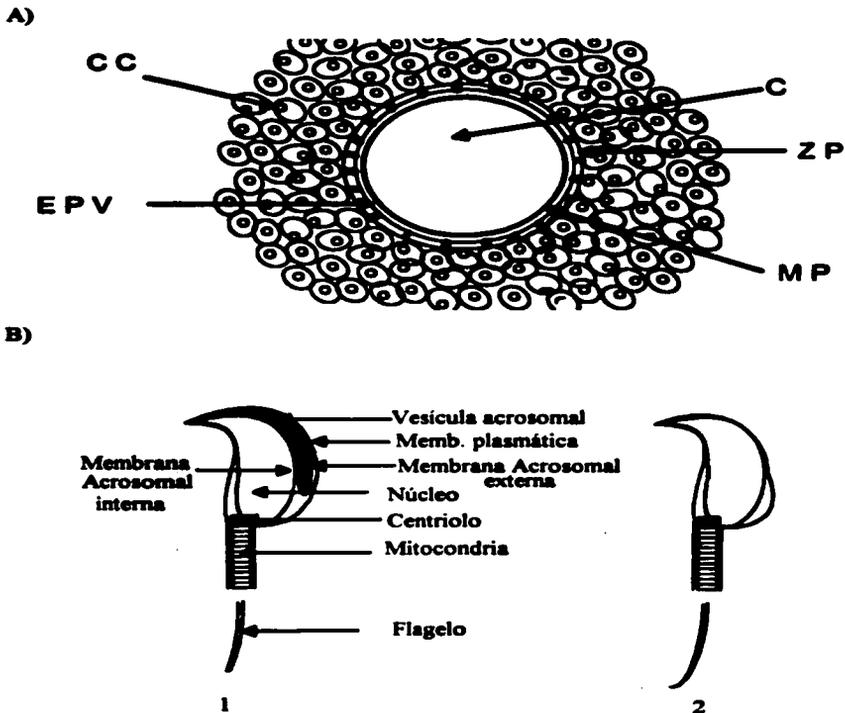


Fig 1.- Esquema de los gametos de mamífero.- A) Ovocito : CC, células del Cúmulo que lo recubren; C, citoplasma; ZP, Zona Pelúcida (inductor fisiológico de la RA); EPV, espacio perivitelino; MP, membrana plasmática. El tamaño de un ovocito supera al del espermatozoide considerablemente. En promedio los óvulos de mamífero miden ~ 80 μm de diámetro (Revisado en 40). **B) Espermatozoide de ratón con sus principales organelos, (1) Sin reaccionar y (2) ya no se ve el acrosoma, es decir está reaccionado.** Las medidas y la forma dependen de la especie, pero en promedio la cabeza mide ~ 4 X 2 μm . (47).

espermatozoide esta mediada por monofosfato de adenosina ciclico (AMP_c), debido a que los niveles de este segundo mensajero aumentan durante el paso del espermatozoide por el epididimo (29). El principal papel del AMP_c es mediar la fosforilación de algunas proteínas esenciales para la iniciación o mantenimiento de la movilidad. La activación de la adenilato ciclasa en la mayoría de las células resulta en la fosforilación de proteínas específicas, por protein cinasas dependientes de AMP_c (1). No hay duda que tanto la adenilato ciclasa como protein cinasas dependientes de AMP_c juegan un papel vital en la iniciación y mantenimiento de la movilidad (1 y 20). En este sentido es interesante saber que el plasma seminal es rico en prostaglandinas y hormonas esteroides que se sabe alteran los niveles de AMP_c en otros tejidos. Recientemente se ha reportado un factor de bajo peso molecular en el plasma seminal porcino que estimula la actividad de la adenilato ciclasa en el espermatozoide (1). Se ha documentado también la fosforilación de una proteína de 55 kD en espermatozoides de la cola del epididimo, no así en los de la cabeza (1). Existe evidencia de que otros factores modulan la movilidad. En el hámster, preparaciones adrenales que poseen la propiedad de estimular la movilidad del espermatozoide tienen altos niveles de los β -amino ácidos taurina e hipotaurina (31). La taurina y su precursor hipotaurina mantienen la movilidad del espermatozoide de hámster durante la capacitación in vitro (30).

La membrana plasmática está dividida en dominios que difieren en composición y función. También se ha demostrado que los dominios son dinámicos, y que experimentan cambios en su organización y composición durante la vida de esta célula. Se piensa que estos diferentes dominios están relacionados con diferentes funciones. La región acrosomal con la exocitosis, la ecuatorial y región postacrosomal con la fusión de gametos, la pieza de en medio con el aporte de energía y la cola con locomoción (1 y 13)

Los diversos dominios muestran diferencias en la distribución de cargas, glicoproteínas y antígenos, así como también diferencias en el contenido de lípidos y partículas de proteína intramembranas (1 y 13).

La superficie del espermatozoide tiene carga negativa, con mayor densidad en la cola que en la cabeza (13). El potencial de membrana (E_m) en reposo es de -42 mV en el espermatozoide de ratón. Esto en medio M-199 (Sigma), ver la sección de material y métodos. Este valor es cercano al determinado anteriormente en espermatozoides de toro en condiciones similares (50 y 67).

Cuando el espermatozoide de mamífero deja el testículo no tiene la habilidad para fecundar al óvulo; obtiene esta habilidad al pasar lentamente a través del epidídimo. La gran mayoría de los espermatozoides se vuelven capaces de fecundar hasta que llegan a la cola de este órgano. Este proceso se llama "maduración epididimal" (20). Se han reportado diferentes cambios en el espermatozoide durante o posterior a la maduración en el epidídimo. La morfología general del núcleo no cambia drásticamente, pero su cromatina se estabiliza por la formación de puentes disulfuro. También los componentes de la cola se estabilizan estableciéndose puentes disulfuro durante la maduración (20). La osmolaridad y composición química del fluido secretado por el epidídimo varía de un segmento a otro. Por ejemplo la $[K^+]$ aumenta de ~20 mM en la cabeza, a ~40 mM en la cola del epidídimo. Por otro lado la $[Na^+]$ disminuye de más de 100 mM en la cabeza a menos de 50 mM en la cola. Por lo anterior es de esperarse que la membrana plasmática del espermatozoide que está en íntimo contacto con este fluido, se altere conforme pasa a través de las diferentes regiones del epidídimo. Es probable que toda la membrana plasmática, tanto de la cabeza como del flagelo cambie sus características químicas durante su paso por el epidídimo (20 y 36).

Por otro lado se ha reportado disminución del contenido de lípidos durante la maduración epididimal en cerdo, toro, cabra y rata, existiendo un contenido rico en colesterol en la membrana plasmática de varias especies de mamíferos. Esto probablemente refuerza la rigidez de esta membrana y previene la RA prematura. El hecho de que el epidídimo, particularmente el cuerpo del epidídimo, tenga una alta síntesis de colesterol, podría sugerir que este lípido es una de las moléculas integradas en la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimal (1, 32 y 20). Sin embargo se ha reportado que el contenido de colesterol del espermatozoide completo de carnero, rata y hámster disminuye durante la maduración en el epidídimo (13). Aunque se ha visto disminución del colesterol, la relación de fosfolípidos-colesterol no cambia de manera importante en la maduración epididimal, no así durante la capacitación, donde dicha relación sí tiene variaciones importantes (13 y 33).

La membrana plasmática también experimenta cambios en la composición de proteínas durante la maduración en el epidídimo. Nuevas macromoléculas de origen epididimal se adsorben o integran a la membrana plasmática. Entre las más prominentes están las glicoproteínas (20), que se integran a la membrana plasmática que cubre la cabeza del espermatozoide durante la

maduración epididimal. Estos cambios ocurren por adición de nuevos componentes a la superficie del espermatozoide, por desenmascaramiento o modificación de superficies preexistentes o por pérdida de componentes de la superficie del espermatozoide. Se han reportado varios sitios de unión a lectinas en el espermatozoide, encontrándose diez veces más densidad en la cabeza que en la cola (13). Por otro lado, estos cambios pueden ser responsables de la mayoría de las modificaciones descritas previamente en las cargas de superficie y sitios de unión a lectinas que ocurre durante la maduración epididimal (13 y 20).

Se cree que en la mayoría de las especies la maduración del espermatozoide se completa cuando alcanza el último segmento de la cola del epidídimo. Sin embargo, en especies donde los espermatozoides se almacenan durante algún tiempo en los vasos deferentes antes de ser liberados (i.e.: hámster chino), la maduración puede continuar o más aún completarse en ese sitio (20).

a.1).- Capacitación.-

El espermatozoide maduro de mamífero no es capaz de fecundar al óvulo después de ser eyaculado. Debe permanecer en el tracto genital femenino por algún tiempo para adquirir la capacidad de fecundar. Aparentemente el espermatozoide sufre algunos cambios fisiológicos dentro del tracto genital femenino, que en conjunto se han denominado "capacitación". El término capacitación se propuso para referirse a los cambios fisiológicos que sufre el espermatozoide y que lo hacen capaz de fecundar al óvulo (11 y 20). Es un fenómeno que experimentan predominantemente los mamíferos. Hace casi 45 años que se descubrió la capacitación por Chang y Austin (20); sin embargo se sabe muy poco a cerca de las condiciones o factores que controlan la capacitación del espermatozoide dentro del tracto genital femenino. Se piensa que productos de secreción del tracto genital femenino son principalmente los responsables de la capacitación del espermatozoide *in vivo*. Se ha propuesto que algunas sustancias controlan la capacitación; sin embargo hace falta más investigación al respecto (20 y 31). La capacitación *in vitro* es posible sin la intervención de secreciones del aparato genital femenino (20). La mayoría de espermatozoides de mamífero puede sobrevivir y capacitarse en un medio artificial similar a una solución Ringer's-Krebs que contiene: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^- , SO_4^- , lactato, piruvato, glucosa, y albúmina. Ninguno de estos componentes es imprescindible para la mayoría de espermatozoides ya que pueden sobrevivir y capacitarse en ausencia de alguno de ellos. El espermatozoide de

hámster no puede sobrevivir si no se le agregan catecolaminas (i.e.: epinefrina) y taurina o hipotaurina (20 y 31).

Los estudios de capacitación *in vitro* han arrojado algunos datos sobre los factores que la controlan o afectan: a) La capacitación del espermatozoide es dependiente de la temperatura, es común utilizar entre 37 y 38°C. Sin embargo para cerdos y ovejas es más eficiente incubarlos a 39°C (20). b) Entre individuos de la misma especie puede variar la velocidad de capacitación; aún en diferentes eyaculaciones del mismo individuo también es posible encontrar pequeñas variaciones. c) En condiciones *in vitro* se han establecido algunos tiempos de capacitación: para el conejo 5-6 hrs, hámster dorado 2 hrs y para el ratón alrededor de 1 hr (20).

Durante la capacitación la movilidad del espermatozoide puede disminuir, sin embargo se sabe que al menos en el inicio y al final del proceso se mueve vigorosamente. Al inicio el movimiento es lineal, y al final es en forma sinusoidal. Algunos espermatozoides desarrollan un movimiento muy activo conocido como "hiperactivación" (11 y 20). También se ha demostrado que aumenta su metabolismo (i.e.: glucólisis y consumo de oxígeno) después de ser incubados en el tracto genital o en el medio de capacitación. Se ha descrito que la concentración intracelular de K^+ ($[K^+]_i$) disminuye significativamente; por otro lado cuando el espermatozoide está listo para la RA, la $[Na^+]_i$ aumenta drásticamente (12, 13 y 20). Poco se sabe sobre la variación de $[Ca^{2+}]_i$ durante la capacitación; sin embargo usando quin-2, un indicador fluorescente para Ca^{2+} , se ha encontrado que la $[Ca^{2+}]_i$ libre no cambia durante la capacitación *in vitro* (20). Recientemente el grupo de Florman reportó que durante la capacitación del espermatozoide el potencial de la célula cambia, desde -30 mV en bovino y -35 mV en ratón, hasta -60 mV en ambos. Esta hiperpolarización de la membrana, se debe en parte a un aumento en la permeabilidad al K^+ . Si este fenómeno se bloquea también se bloquea la RA inducida por ZP. Esto puede significar, que el potencial de membrana ejerce un control importante sobre la capacidad para fecundar del espermatozoide (92).

En la mayoría de especies la estructura del acrosoma no cambia notablemente durante la capacitación. El núcleo del espermatozoide de la mayoría de mamíferos también se mantiene estable a través de la capacitación. Esto se debe a la presencia de abundantes puentes disulfuro entre proteínas nucleares (20 y 1). Se han identificado antígenos de superficie en la membrana plasmática que se desprenden ó alteran durante la capacitación, tanto en la región de la cabeza

como también en la cola (12, 13 y 20). De este modo se infiere que las proteínas o glicoproteínas liberadas y/o agregadas a la superficie del espermatozoide durante la capacitación deben ser proteínas periféricas. Los cambios anteriores, al parecer, contribuyen a que el espermatozoide tenga un movimiento flagelar normal y se expongan sitios de reconocimiento para las cubiertas del óvulo (11,12, 13, 20 y 4). Se han descrito cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación. El fosfatidil inositol aparentemente aparece hasta que los espermatozoides se capacitan. La metilación de fosfolípidos (i.e.: conversión de fosfatidil etanolamina a fosfatidil colina) parece ocurrir durante la capacitación en el espermatozoide de hámster (13 y 20). Parece ser que los espermatozoides expuestos a un medio capacitante pierden parte del colesterol de su membrana plasmática. Con base en esto se ha propuesto que la eliminación gradual del colesterol por la albúmina (o algunos otros componentes del tracto genital femenino) es una parte esencial de la capacitación. Por otra parte hay reportes que dicen que la fluidez de los lípidos de la membrana de la cabeza y la cola cambian como resultado de la capacitación. Además existen zonas en la membrana del espermatozoide en las que los lípidos no son difusibles aún antes de la capacitación. Es razonable inferir que la cubierta de moléculas sobre la superficie de espermatozoides no capacitados sirve para limitar la fluidez de la membrana y posiblemente restringir el movimiento de proteínas membranales cuya interacción pueda requerirse para la iniciación de la fusión de membranas (13, 20 y 34).

a.2).- Acrosoma y RA.-

El acrosoma es un corpúsculo rodeado de membrana que está sobre el núcleo del espermatozoide maduro (acro = punta; soma = cuerpo). Es producto del complejo de Golgi y se sintetiza y ensambla durante la espermatogénesis. El interior del acrosoma tiene un pH ácido y contiene una variedad de enzimas (hidrolasas ácidas) tales como hialurodinasa, β -N-acetil glucosaminidasa, y fosfatasa ácida; además de la proteasa de pH neutro proacrosina. Se considera que el acrosoma es un lisosoma modificado; pero no interviene en procesos degradativos dentro del espermatozoide, sino más bien es una vesícula exocitótica. Este organelo se forma en la última fase de la espermatogénesis, primero como una colección de gránulos localizados cerca del núcleo, en asociación cercana al prominente aparato de Golgi. Cuando el desarrollo avanza, estos gránulos coalescen y forman un gránulo principal que se une al núcleo y gradualmente se agranda. Con el tiempo se expande a lo largo de la superficie nuclear formando un gorro sobre un polo del núcleo.

Después de esto el acrosoma se separa de su asociación íntima con el complejo de Golgi, y se aleja. Posteriormente junto con otros cambios dentro de la célula, el acrosoma gradualmente asume la forma que posee en el espermatozoide maduro. Durante la maduración epididimal, a pesar de los cambios que sufre la célula, la forma del acrosoma ya es característica de cada especie. La morfología del acrosoma varía mucho entre especies; sin embargo su estructura básica y función son similares en todos los mamíferos (2, 16, 19 y 35).

En las especies en las que el espermatozoide tiene acrosoma, que son la mayoría, la RA es un requisito indispensable para que esta célula pueda fecundar al óvulo. Durante ésta reacción la membrana externa del acrosoma se fusiona con la membrana plasmática, ocurriendo como consecuencia la liberación del contenido acrosomal (37 y 38). El acrosoma contiene enzimas degradativas que abren un trayecto a través de las paredes externas del óvulo, (fig 2). Aunque algunas de estas enzimas pueden estar integradas dentro, o sobre la membrana acrosomal, las enzimas acrosomales son las más importantes en la degradación de las capas externas del óvulo. De las diversas enzimas acrosomales que se han encontrado, la hialurodinasa, la acrosina y su zimógeno proacrosina son de las más estudiadas. Su presencia en la matriz acrosomal se ha demostrado mediante técnicas citoquímicas o inmunocitoquímicas a nivel de microscopía electrónica (19, 16 y 20). En la mayoría de los mamíferos, el óvulo está rodeado por un tipo de células llamadas del cúmulus; el principal componente de la matriz del cúmulus es el ácido hialurónico. Se cree que la hialurodinasa presente en el acrosoma se encarga de digerir este ácido hialurónico. A la acrosina se le atribuyen los siguientes efectos: a) induce o asiste en las fusiones múltiples entre las membranas externa del acrosoma y plasmática del espermatozoide, b) dispersa la matriz del acrosoma durante la RA, c) participa en la unión del receptor del espermatozoide a los ligandos de la zona manteniendo al espermatozoide unido una vez que la RA ha ocurrido, d) ayuda al espermatozoide a penetrar la zona pelúcida. También puede participar en la fusión del espermatozoide con el óvulo. La proacrosina es el precursor (zimógeno) de la acrosina (11, 16, 20 y 39). La velocidad a la que se lleva a cabo la RA puede variar entre las diferentes especies, y depende de las condiciones del espermatozoide y del medio al que esté expuesto. Se piensa que no todos los espermatozoides expuestos a zonas pelúcidas sufren la RA al mismo tiempo. Aproximadamente a los 2 min. una parte de los espermatozoides expuestos a la

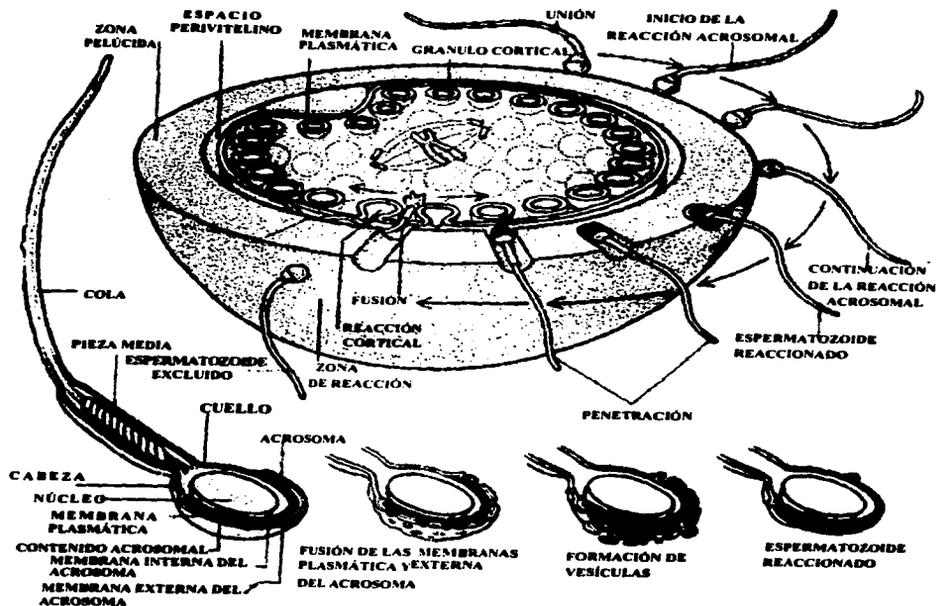


Fig. 2.- Diagrama que describe los pasos que llevan al espermatozoide a experimentar la RA. El inductor es la ZP₃, que provoca la fusión de las membranas externa acrosomal y plasmática del espermatozoide, con esto se liberan las enzimas líticas que abren un trayecto a través de las cubiertas externas del óvulo. Muy cerca de la membrana plasmática del óvulo se encuentra una serie de gránulos; poco después de que se fusiona el espermatozoide liberan su contenido al exterior y modifican las condiciones fisicoquímicas de la ZP. Con esto se evita que otros espermatozoides se fusionen posteriormente. Este fenómeno conocido como Reacción Cortical es uno de los mecanismos de los que se vale el óvulo para evitar la poliespermia. Revisado en (16).

zona pelúcida completan la RA; la mayor parte reaccionan después de 15 a 30 min. Estos resultados se obtuvieron en ratón, hámster y cuyo (20). Más recientemente se vio que, en el espermatozoide de bovino la RA se completa de 12-13 min después de exponerlos a ZPs (91). Este proceso excitotóxico, que es dependiente de Ca^{2+} externo sucede en otras células (i.e.: en la liberación de enzimas pancreáticas y en la liberación de neurotransmisores en terminales nerviosas). El Ca^{2+} a concentraciones mM, facilita la fusión entre dos membranas uniéndose a los fosfolípidos aniónicos e induciendo separación de fase de los fosfolípidos de membrana.

Durante la RA. suceden eventos que se han caracterizado en el erizo de mar: a) hay un influjo de Ca^{2+} y Na^+ y salida de K^+ y H^+ , lo que da como resultado un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, de pH_i y cambios en el potencial de membrana (41, 42, 43). En el espermatozoide de mamífero los flujos de Ca^{2+} y H^+ que ocurren durante la RA, parecen ser análogos a los que se presentan en el erizo de mar (67, 90, 91 y 95). La ZP depolariza y alcaliniza la célula, dando como resultado un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, y la RA. Si se bloquea alguno de estos cambios, la RA se produce con mucha menor eficiencia (91). De alguna manera estos cambios son mediados por proteínas G ya que la toxina pertussis (PTX), un inactivador específico de proteínas G del tipo G_i y G_o , inhibe a ambos cambios en el espermatozoide de ratón, bovino y humano (38, 40 y 47). Aunque más recientemente se reportó que es el aumento de pH el que es sensible a PTX (91). También se ha detectado en el espermatozoide de mamífero la presencia de G_s , otro tipo de proteína G, la cual es insensible a la PTX (21). Por otro lado también existen referencias que dicen que durante la RA. hay aumento de la concentración de AMP_c, GMP_c e IP₃, cuyo papel es clave en la transducción de señales dentro de la célula, funcionando como segundos mensajeros durante la RA (44, 40, 45 y 46). Recientemente se detectaron miembros de la familia del receptor olfatorio acoplados a proteínas G en el espermatozoide de perro. No se conoce el papel de estas moléculas pero se propone que podrían participar en la quimiotaxis del espermatozoide durante la fecundación (26). Reportes recientes han indicado que el fluido folicular humano en la mujer contiene compuestos que participan en la quimiotaxis y/o quimiocinesis; además estos compuestos pueden cambiar la manera de moverse del espermatozoide (40). La RA puede considerarse por si misma como un proceso de selección diseñado para asegurar que el espermatozoide que logre depositar la información genética dentro del óvulo, sea miembro de una población de espermatozoides que,

estén en óptimas condiciones. Los procesos de selección celular en el tracto genital femenino representan un importante fenómeno biológico y no son los únicos presentes en la naturaleza (35).

Además de la ZP, la RA puede inducirse *in vitro* por la exposición a otros agentes fisiológicos como células del cúmulus o fluido folicular y por agentes químicos como los ionóforos de Ca^{2+} A23187 y ionomicina(18). Se ha comprobado que la progesterona que se encuentra almacenada o que se produce en las células del cúmulus, induce excitosis del acrosoma (23). Cuando el espermatozoide de ratón se expone primero a la progesterona y después a la ZP la RA se incrementa; en comparación con la exposición a los dos agonistas juntos o en orden inverso (23). Aparentemente la progesterona actúa sobre un receptor tipo GABA_A , ya que el efecto de este esteroide es similar al obtenido usando ácido γ -aminobutírico (GABA), y se bloquea por bicuculina un antagonista conocido del receptor a GABA. (23, 55 y 40).

El A23187, conocido también como calcimicina, es un antibiótico producido por una cepa de *Streptomyces Chartreusensis*. Este compuesto se comporta como un ionóforo de cationes divalentes por que es capaz de atravesar la bicapa lipídica ya que tiene una superficie hidrofóbica. Se ha utilizado como herramienta bioquímica para introducir Ca^{2+} en células y organelos. La RA es un fenómeno dependiente de Ca^{2+} externo (20), por lo que al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]$, en el espermatozoide mediante el uso de A23187 se produce la excitosis acrosomal (53 y 54).

b).- El Óvulo.-

El óvulo es la célula que la hembra aporta para la fecundación, contiene toda la maquinaria necesaria para que después de recibir al espermatozoide inicie el desarrollo de un nuevo individuo.

Los óvulos son producidos en el ovario, y cuando están totalmente maduros son liberados. Al salir del ovario los gametos van rodeados por una nube de células foliculares (fig 1-A) a las que se conoce como "cúmulus oophorus" (cúmulus = nube). En la mayoría de mamíferos, el cúmulus persiste alrededor del óvulo *in vivo* no sólo durante la fecundación sino también por algún tiempo después que el óvulo fue fecundado. La presencia del cúmulus no es esencial para la fecundación *in vitro*, pero su presencia puede facilitarla, sirviendo de apoyo para la unión del espermatozoide. Se cree que evita que el espermatozoide se aleje por efecto de su movilidad después de sufrir la RA y durante el periodo de unión secundaria, asegurando la segunda unión (9, 11 y 20).

Otra capa que se encuentra recubriendo al óvulo es la zona pelúcida (ZP), llamada así por su clara apariencia (pelúcida = clara), es el inductor fisiológico de la RA en mamífero. Está constituida por tres glicoproteínas sulfatadas; ZP1, ZP2 y ZP3; las cuales están muy conservadas en todos los óvulos de mamíferos. (i.e.: la ZP₁ tiene una homología de 67% entre el humano y el ratón, 20 y 76). Las glicoproteínas de la ZP están interconectadas en filamentos, ensambladas en paquetes y dispuestas en capas estratificadas presentes aproximadamente cada 150 Å. Los enlaces son escasos entre los paquetes y de naturaleza no covalente, esto hace a la ZP muy elástica, por lo que sería posible que la delgada cabeza del espermatozoide penetre también mecánicamente ayudado por la movilidad de su flagelo (1, 40, 11, 24 y 20). Está reportado que de una hembra se pueden obtener de 180 a 220 ZPs, y cada una pesa de 3-4 ng (Bleil, 1993). Para inducir la RA *in vitro* con ZPs se utilizan diferentes concentraciones que van de 20 (nuestro grupo), a 50 µg/µl (95). Esto equivale de 5 a 17 ZPs/µl.

La ZP₁ es una glicoproteína de ~ 83 kDa es el principal componente de la ZP, encontrándose más de un billón de moléculas de ZP₁ en óvulos de ratón. La ZP₁ tiene la propiedad de ser el receptor primario del óvulo al espermatozoide y además de inducir en éste la RA. (1, 6, 11, 16, 19, 20, 24 y 40). Se calcula que la cabeza del espermatozoide tiene aproximadamente de 10 a 50,000 sitios de unión para la ZP₁ (11). La ZP₂ (~120 kDa.) funciona como el receptor secundario para el espermatozoide. Mientras que la unión primaria se establece entre la membrana plasmática del espermatozoide y la ZP₁, la unión secundaria se establece entre la membrana acrosomal interna y la ZP₂ posterior a la RA (20 y 24). Es probable que la unión secundaria represente la estrecha asociación entre el espermatozoide y la ZP durante su penetración, promovida por las enzimas acrosomales. La ZP₂ sirve como sustrato para la proteasa acrosomal (11 y 20). En experimentos probando ZP₂ marcada con I¹²⁵ se ha encontrado que se asocia específicamente con las cabezas de espermatozoides reaccionados (11). Como ya se dijo, sólo los espermatozoides capacitados y reaccionados se unirán a la ZP del óvulo de ratón, específicamente en la ZP₁. Una vez que esta unión ya se ha dado el espermatozoide se unirá otra vez y permanecerá unido durante su penetración en la ZP. Es probable que estos sitios de afinidad por la ZP₂ en la cabeza del espermatozoide reaccionado sean muy numerosos pero de baja afinidad, ya que la disociación de una proteasa y los productos proteolíticos es muy rápida. Por otro lado, si estas uniones fueran muy fuertes el espermatozoide se quedaría en la ZP para siempre (20). Si no

existiera esta segunda unión es posible que el espermatozoide sólo golpeará ligeramente a la ZP, sin tener el tiempo suficiente para una estrecha asociación. De hecho el número de sitios de unión para la ZP₂ en el espermatozoide es mayor que para la ZP₁ (11). La ZP₁ (~200 kDa) sirve para mantener unida la estructura de la ZP actuando como puente entre la ZP₂ y la ZP₃ (24).

En muchas especies las propiedades de la ZP cambian drásticamente después de la fecundación, en especial la ZP₁. Esto evita que otros espermatozoides puedan penetrar la ZP; y representa una de las estrategias que utiliza el óvulo para evitar la poliespermia. Dicha estrategia conocida como reacción de zona, no sucede en todas las especies de mamíferos (20). La mayoría de espermatozoides tardan 30 min. o más antes de que empiecen a atravesar la ZP y se estima que en el ratón el espermatozoide tarda ~ 20 min en atravesar la ZP *in vitro*. Aparentemente el movimiento vigoroso de la cola es esencial para la exitosa penetración de la zona; sin embargo un fuerte movimiento solamente no es suficiente para un efectivo paso a través de la ZP. Lo más probable es que el espermatozoide use tanto medios mecánicos como medios enzimáticos para poder atravesar las cubiertas del óvulo (20).

Debajo de la membrana plasmática, dentro del óvulo no fecundado de la mayoría de animales vertebrados e invertebrados, existe una capa de pequeños organelos cubiertos por membrana conocidos como gránulos corticales. La entrada de un espermatozoide hace que el óvulo libere el contenido de los gránulos corticales hacia el exterior, (fig 2). La liberación de los gránulos corticales ocurre por el mismo mecanismo que la del acrosoma del espermatozoide y es precedida también por una onda de aumento de $[Ca^{2+}]_i$. En el hámster la liberación de Ca^{2+} empieza cerca del punto donde se fusiona el espermatozoide (20). Entre las sustancias que se liberan de los gránulos corticales hay enzimas que modifican las características físicas y químicas de la ZP, de tal forma que los espermatozoides no pueden ya penetrarla (19, 20 y 37). Aunque la exocitosis de los gránulos corticales es un buen indicador de la activación de óvulos, no es absolutamente necesario para la iniciación del desarrollo normal del embrión. La iniciación del desarrollo sin exocitosis de gránulos corticales o con exocitosis incompleta, es posible en mamíferos (48).

Varios grupos han intentado la identificación del receptor del espermatozoide a la ZP₃. Existen por lo menos tres candidatos: a) Evidencias inmunológicas sugieren que puede ser una galactosiltransferasa que está localizada sobre la membrana plasmática que recubre la cabeza del

espermatozoide. Además haciendo mutaciones en las que se logró sobreexpresar dicha galactosiltransferasa, se obtuvo una unión más fuerte y como consecuencia una mayor fecundación del espermatozoide (11, 20, 49 y 76). b) Mediante electroforesis de geles de proteínas del espermatozoide se detectó que la ZP₁ une a una proteína de 25 kDa. Anticuerpos dirigidos contra fosfotirosina se unen a esta proteína, que también se localiza en la región acrosomal del espermatozoide de ratón (11). Se postula que esta proteína sea una tirosinasa y se autofosforile o sólo sea sustrato de otra cinasa ya que parece fosforilarse de manera dependiente de AMP_c (50). Lo que sí se sabe es que la inducción de la RA por la ZP₁ tiene que ver con la fosforilación de varias proteínas incluyendo la de 25 kDa (11 y 50). c) Una proteína homomultimérica de 56 kDa conocida como sp56, tiene muchas de las propiedades esperadas para poder reconocer a la ZP₁. En columnas de afinidad se une a la ZP₁ y no así a la ZP₂. En experimentos de entrecruzamiento se demostró que la ZP₁ específicamente se asocia con esta proteína sobre la superficie de la cabeza del espermatozoide. La sp56 bloquea el reconocimiento del óvulo al espermatozoide. Esta proteína tiene dominios de reconocimiento a carbohidratos que tienen una alta homología con los dominios que contienen lectinas previamente caracterizadas. Esto es de esperarse ya que la sp56 es una lectina que tiene afinidad por α -galactosa. La sp56 sólo se ha encontrado en el espermatozoide de ratón y hámster. Ambas especies reconocen a la ZP del ratón. Sin embargo sp56 no se encontró en el espermatozoide de humano y cuyo, los cuales no se unen a la ZP del ratón. El reconocimiento y la unión del óvulo con el espermatozoide en mamíferos es extraordinariamente especie-específico. Es probable que sp56 sea parte de esa especificidad y las especies que no la contienen pueden tener otra proteína con baja homología a la sp56. En testículo de rata se ha identificado una proteína de 54 kDa que tiene afinidad por galactosa (11 y 52).

Del mismo modo, también se ha estudiado el probable receptor del espermatozoide a la ZP₂. Es posible que este papel lo realice la acrosina, la más abundante de las enzimas acrosomales. Las evidencias que apoyan esto son: a) La acrosina tiene especificidad por sustratos como la tripsina (inhibidores de proteasa bloquean la unión secundaria a la ZP, no así a la primaria), b) proteínas de ZP₂ solubles y marcadas con ¹²⁵I se unen a proteínas de espermatozoide total en geles separadas por electroforesis. Aún no existe evidencia directa que apoye esta idea (11 y 20). Se piensa que los receptores del espermatozoide a la ZP son del tipo lectinas con

actividad de unión a sacáridos; y se propone que la unión del espermatozoide a la ZP se realiza en la forma de enzima-sustrato (20).

I.2.- FUSIÓN DEL ÓVULO CON EL ESPERMATOZOIDE:

La fusión de célula a célula es parte importante de varios procesos biológicos incluyendo la fecundación e invasión de células por agentes infecciosos. Los mecanismos de fusión de membranas no están claramente entendidos pero actualmente se piensa que comprenden al menos siete pasos (56).

Por experimentos de microscopía electrónica se ha detectado que la primera región de la membrana plasmática del espermatozoide de mamífero que se fusiona con el óvulo es la región ecuatorial (4 y 20).

En el óvulo maduro hay por lo menos dos regiones distintas en la membrana plasmática: El dominio libre de gránulos corticales que está sobre los cromosomas en metafase y el resto del óvulo que lo forma una zona que además de contener gránulos corticales también contiene microvellosidades. En la zona libre de gránulos corticales también hay carencia de microvellosidades y una más alta densidad de actina cortical (4 y 20). La fusión del óvulo con el espermatozoide preferencialmente se realiza en la zona que contiene gránulos corticales; y no ocurre o raramente ocurre en la zona libre de microvellosidades. (4 y 20). Los mecanismos moleculares por los cuales la zona libre de microvellosidades es preferencialmente excluida no se conoce. El estudio de la fusión del óvulo con el espermatozoide puede dificultarse debido a las limitaciones de la disponibilidad de gametos. También a la inaccesibilidad de los procesos *in vivo*, lo cual obliga a que la mayoría de estudios se realicen *in vitro*.

La RA es un requisito para que el espermatozoide pueda fusionarse con el óvulo (4 y 20); espermatozoides que no sufren la RA solamente se unen a la membrana del óvulo pero no se fusionan (20). La RA puede inducir un cambio en la superficie del espermatozoide que permite que ocurra la fusión. Yanagimachi ha mostrado que el espermatozoide de hámster con el acrosoma intacto y tratado con el contenido acrosomal crudo, es incapaz de fusionarse con óvulos libres de ZP (20). Esto habla de que el contenido acrosomal es útil pero no suficiente para la adquisición de fusibilidad del espermatozoide y que otros procesos fisiológicos requeridos, ocurren durante la RA. Probablemente se exponen nuevas proteínas de superficie.

Por el contrario la movilidad no es un requerimiento absoluto para la fusión; espermatozoides inmóviles o débilmente móviles pueden fusionarse con óvulos libres de ZP (4 y 20).

A diferencia de lo que sucede con el espermatozoide, los óvulos adquieren la capacidad de fusión antes de que completen su madurez. Los ovocitos de hámster adquieren la capacidad de fusionarse cuando alcanzan un tamaño de 20 μm de diámetro, cuando las microvellosidades y la ZP empiezan a aparecer (4). La habilidad del óvulo para fusionarse con el espermatozoide es transitoria, después de la fecundación la membrana plasmática del cigoto pierde su habilidad para fusionarse con otros espermatozoides. Esta pérdida de la fusibilidad del ovocito fecundado varía según la especie: en conejos es inmediata, pero en el hámster a pesar de que la fusibilidad disminuye drásticamente, no se suspende por completo hasta el estado de 8 células de la embriogénesis (4). Por otro lado existe una especificidad de especie para la unión y fusión de las membranas de los gametos, esto crea una restricción para que la fusión de dos células de diferentes especies se realice. De todas las especies de mamíferos hasta ahora estudiadas, el óvulo del hámster es el más disponible para permitir la penetración por espermatozoides de otras especies. Sin embargo, aún este óvulo muestra preferencia para fusionarse con el espermatozoide de su misma especie. Existen reportes de unión entre gametos de especies diferentes pero sin llegar a la fusión (4).

Se sabe con certeza que la membrana plasmática del espermatozoide se integra totalmente y se hace parte de la membrana plasmática del óvulo durante la fecundación (20).

1.3- MOLÉCULAS DEL ESPERMATOZOIDE INVOLUCRADAS EN LA UNIÓN Y FUSIÓN :

La unión y fusión del espermatozoide son eventos independientes; bajo ciertas condiciones el espermatozoide puede unirse a la membrana del óvulo sin fusionarse. Sin embargo, se asume que la unión es un prerrequisito para la fusión. Mediante experimentos de inhibición por anticuerpos se han logrado identificar proteínas que tienen un papel en la unión y/o fusión del óvulo con el espermatozoide:

a) PH30.- Es una proteína integral de membrana con dos subunidades (α 45-49 kDa. y β 25-33 kDa.), fue identificada en la cabeza del espermatozoide de cuyo. Anticuerpos contra esta proteína

inhibe la fusión pero no la unión del óvulo con el espermatozoide de una manera dependiente de la dosis, aproximadamente en un 74 %. La secuencia de aminoácidos de las dos subunidades de PH30 también muestra características que sugieren un papel en la fusión de los gametos. Ambas subunidades tienen homología con desintegrinas, una familia de ligandos que se unen a integrinas. Las integrinas son una clase de proteínas de adhesión a la superficie celular (4). PH30 también muestra cambios en la expresión de epitopes simultáneamente con el cambio en localización. Esta proteína permanece en la región posterior de la cabeza después de la RA, un lugar apropiado para poder participar en la fusión (4).

b) **DE** es una proteína identificada en el espermatozoide de rata, está compuesta por dos polipéptidos de 37 kDa (D y E). Esta proteína es periférica y se encuentra más estrechamente unida que la mayoría de proteínas periféricas. Estudios de inmunofluorescencia muestran que DE inicialmente está en la región dorsal del acrosoma, pero cambia su localización a la región ecuatorial durante la capacitación (4). Anticuerpos dirigidos contra DE inhiben la fecundación *in vivo* e *in vitro* aproximadamente en un 80 %, comparado con el control sin anticuerpo 20 %. Preparaciones parcialmente purificadas de DE que provienen del epidídimo son capaces de unirse al óvulo e inhibir la fusión del espermatozoide en una manera dosis-dependiente, sin embargo la unión no se inhibe. Se propone que DE participa en un paso de fusión subsiguiente a la unión del espermatozoide.

c) Se identificaron dos anticuerpos monoclonales, M29 y M37 contra el espermatozoide de ratón. Ambos anticuerpos inhiben la fusión del espermatozoide con el óvulo de ratón, y reconocen antígenos que están sobre la región ecuatorial del espermatozoide. M29 reconoce una banda de 40 kDa en "Western blots", es aparentemente un producto de ruptura de un polipéptido de 60 kDa. El antígeno que reconoce M37 no se ha caracterizado (4).

d) **OBF 13** es otro anticuerpo monoclonal dirigido contra el espermatozoide de ratón que también inhibe la fusión del óvulo con el espermatozoide en un 83 %. OBF 13 no inhibe la unión del espermatozoide con óvulos de hámster. Esto sugiere que este anticuerpo está dirigido contra una molécula de reconocimiento especie específica. El anticuerpo se une a la cabeza completa de espermatozoides que han sido incubados en medio capacitante conteniendo Ca^{2+} ó induciendo la RA con A23187. No se une a espermatozoides del epidídimo recién obtenidos (4).

e) Otro anticuerpo dirigido contra el espermatozoide reaccionado de humanos, conocido como MH61 inhibe la fusión del espermatozoide de humano con óvulos de hámster libres de zona en un 70 % . MH61 reconoce una proteína de 43 kDa en "Western blots". Este anticuerpo se une en la cabeza, incluyendo el segmento postecuatorial de espermatozoides reaccionados. MH61 no se une a espermatozoides sin reaccionar (4).

I.4.- MOLÉCULAS DEL ÓVULO INVOLUCRADAS EN LA FUSIÓN :

Varias líneas de evidencia sugieren que una integrina de la superficie del óvulo puede ser el receptor para una molécula de superficie del espermatozoide que actúa en el paso de unión que guía a la fusión (4). Como ya dijimos las integrinas son una clase de moléculas de adhesión celular que unen células a la matriz extracelular o a otras células. Las integrinas se han encontrado sobre la superficie de muchos tipos de células incluyendo el óvulo de humano y hámster. Las desintegrinas es una clase de ligandos de integrinas. Esta clase de ligandos contienen un tripéptido formado por Arginina, Glicina y Ac. Aspártico en sus dominios de unión, además se sabe que péptidos que incluyen este tripéptido evitan la fusión del espermatozoide con el óvulo (4 y 40). Por otro lado tratamientos con proteasa sobre óvulos libres de ZP reduce el porcentaje de fusión. La efectividad en la fusión se recupera después de 6 hra. La pérdida y subsecuente recuperación de los niveles de fusión coincide con la desaparición y reaparición de una banda de 94 kDa en la superficie del óvulo. Con base en su tamaño, esta proteína de 94 kDa podría ser una subunidad β de una integrina que participa en la fusión de los gametos (4 y 14).

Transitorios de Ca^{2+} y oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son una característica común de la respuesta de células somáticas a un amplio rango de señales intra y extracelulares. Posterior al evento de fusión se inicia en el óvulo fecundado una onda de incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, justo en la zona donde ocurrió la fusión del espermatozoide. El inicio de esta onda transitoria de Ca^{2+}_i puede tomar desde segundos, en el óvulo de hámster, hasta minutos en el de ratón. Este retraso, que sugiere una reacción enzimática o limitaciones de difusión, está determinada por el espermatozoide (40). Cuando el espermatozoide se fusiona con el óvulo incorpora todos sus segundos mensajeros, enzimas y sistemas de transporte iónico. Durante la fusión suceden cambios drásticos en ambas células; inicialmente el espermatozoide se hiperpolariza hacia el potencial del óvulo y después el óvulo se depolariza. Estos cambios de potencial pueden modular canales en el espermatozoide,

que ahora es parte del óvulo, así como también los propios del óvulo, comenzando las cascadas de señales que iniciarán el desarrollo (40).

I.5.- FUSIÓN DE MEMBRANAS:

Las células necesitan organizar sus espacios acuosos con el objeto de compartimentalizar su interior, deben fusionar sus membranas para poder mezclar su contenido. Por ejemplo el espermatozoide con el óvulo se fusionan para lograr la fecundación. Los estudios más detallados de mecanismos moleculares de la fusión de membranas se han tomado de la fusión de algunos virus con la célula huésped. Sin embargo aunque existen diferencias significativas en la fusión de célula a célula eucariótica, los principios básicos y aún detalles mecánicos pueden ser los mismos (4). La mayoría de los eventos de fusión de membranas involucra las membranas dentro de una misma célula, y estos procesos se han estudiado intensamente. Se sabe mucho menos acerca de los mecanismos moleculares de fusión entre las membranas de dos células. Los mecanismos de esta fusión de membranas todavía no están bien claros; sin embargo en el presente se cree que existen al menos siete pasos distintos : inicio, acoplamiento de membrana, contacto íntimo de membrana, mezcla de lípido/proteína, apertura del poro de fusión, ampliación del poro de fusión, y mezclado del contenido (56). A continuación se describen algunos de estos pasos:

a).- Acoplamiento y contacto íntimo.- En algunos sistemas durante la fusión de membranas no hay acoplamiento(i.e.: neutrófilos y mastocitos). En otros sistemas como en el paramecio, durante la descarga de tricocistos y en la exocitosis de gránulos corticales del óvulo de erizo de mar, los gránulos secretorios ya están en contacto muy cercano con la membrana (< 5 nm). En la unión neuromuscular de la rana aparecen vesículas sinápticas que se alinean en zonas activas. También en mamífero existen estas zonas activas donde las vesículas sinápticas se acoplan (57 y 58). Aunque el acoplamiento de membranas es un requisito para la fusión, no necesariamente conduce a la fusión. En los gametos la unión con el óvulo ocurre en espermatozoides tratados con dos diferentes anticuerpos monoclonales, sin embargo la fusión no se realiza (56).

b).- Poros de fusión: Durante la fusión de membranas biológicas se forma un poro de fusión medible por experimentos de capacitancia de célula entera (4 y 56). En experimentos a baja temperatura se logró ver que la formación del poro de fusión fue creciendo continuamente y no abruptamente como sucede en canales iónicos. En mastocitos la conductancia inicial del poro de fusión es de 50 a 1500 pS. El diámetro calculado del poro inicial es de 1-4 nm (56). La formación

del poro de fusión es reversible, es decir, el poro de fusión puede cerrarse, un fenómeno conocido como fluctuación. En la fusión del óvulo con el espermatozoide también se ha detectado la formación reversible del poro de fusión (56). Una conclusión general entre los investigadores es que la fusión de membranas biológicas está mediada por proteínas, pero poco se sabe acerca de las proteínas que median la mayoría de reacciones de fusión biológica (56). Muchas proteínas intracelulares se han propuesto como proteínas de fusión en la exocitosis, tráfico intracelular y transmisión sináptica (56 y 57). En algunos sistemas como liberación de vesículas exocitóticas la proteína de fusión sólo está en una de las dos membranas. El hecho de que las proteínas de fusión necesiten sólo estar presentes en una de las dos membranas, significa que los lípidos mismos pueden ser el blanco para la fusión de membranas biológicas mediadas por proteínas (56). La aposición de membranas lipídicas está sujeta a fuerzas de repulsión por hidratación; sin embargo lípidos con baja hidratación promueven la fusión (i.e.: fosfatidiletanolamina). Debido a que los lípidos hidratados se repelen a cortas distancias, se debe desarrollar presión en la región de aposición (56). Se ha propuesto y probado un mecanismo para la fusión de bicapas lipídicas el cual puede tener relevancia en la fusión biológica. En bicapas lipídicas planas se logró ver primero la fusión de las monocapas externas, en el segundo y subsecuente paso se completa la fusión de las monocapas internas (56).

Se sabe por experimentos de difracción de rayos X y RMN que existen tres formas moleculares de los componentes de lípidos : conos (i.e.: fosfatidiletanolaminas y cardiolipinas en la presencia de iones Ca^{2+}), cilindros (i.e.: fosfatidilcolina), y conos invertidos (i.e.: lisofosfatidilcolina). Los conos tienden a formar preferentemente micelas invertidas, los cilindros bicapas y los conos invertidos micelas. Las formas de lípidos en monocapas tienden a formar curvaturas espontáneas. Los conos, cilindros y conos invertidos forman curvaturas negativa, cero y positiva respectivamente. La fusión de bicapas lipídicas es muy sensible a la curvatura espontánea de sus constituyentes (56).

La tensión mecánica, hidratación y curvatura espontánea de las membranas biológicas pueden modularse por todos los componentes encontrados en las membranas celulares. Las proteínas pueden interactuar con lípidos para cambiar la curvatura espontánea, repulsión y tensión, ya sea directa o indirectamente a través de actividad enzimática (56).

16.- CANALES IÓNICOS:

La bicapa lipídica, que constituye la parte estructural más importante de las membranas biológicas, permite el paso de no electrolitos de acuerdo con su constante de partición en ella. Sin embargo la bicapa es una barrera energética muy efectiva al paso de moléculas cargadas. Existen en las membranas biológicas moléculas que son capaces de facilitar el paso de iones tanto a favor como en contra de su gradiente electroquímico. Estas proteínas de membrana permiten que la célula pueda generar y utilizar la asimetría en la composición iónica entre los distintos compartimentos celulares (59). Las proteínas de membrana que transportan iones a favor de su gradiente electroquímico se conocen como acarreadores y canales. Cuando el transporte se lleva a cabo en contra del potencial electroquímico es mediado por bombas. Este transporte implica gasto de energía (59).

Los canales iónicos son proteínas intrínsecas que atraviesan la membrana celular formando un poro hidrofílico (fig 3), a través del cual se cataliza el flujo de iones (59 y 61). La idea de que las corrientes iónicas estaban mediadas por estructuras como poros fue primeramente sugerida por Hodgkin y Keynes en 1955 (61).

El transporte de iones a través de los canales es muy eficiente, alcanzándose de 10^6 a 10^8 iones seg^{-1} con una fuerza electromotriz de 100 mV. Esta eficiencia es mayor a los de la gran mayoría de las enzimas solubles, incluso las más rápidas, como la anhidrasa carbónica cuyo número de recambio es del orden de $1 \times 10^6 \text{ seg}^{-1}$ (59, 61 y 62).

Los acarreadores por su parte tienen una efectividad de transporte varios ordenes de magnitud menor que los canales, y algunas ATPasas sólo mueven del orden de 100 iones seg^{-1} (61). Esta característica ha permitido el desarrollo de estrategias experimentales que permiten observar la actividad de un solo canal tanto *in vivo* como reconstituido en membranas modelo. Los canales efectúan el flujo de iones selectivamente, y la célula regula finamente este flujo. Los canales son específicos para un ion; su nomenclatura se basa en el nombre del ion que transportan más eficientemente en condiciones fisiológicas, existiendo canales de Na^+ , de K^+ , de Ca^{2+} , de Cl^- , etc (62 y 63). Los canales se pueden clasificar con base en la manera en que son regulados por la célula, existiendo canales: operados por ligando, por el voltaje, por ambos, por tensión, por metabolitos celulares, etc (59, 62 y 63).

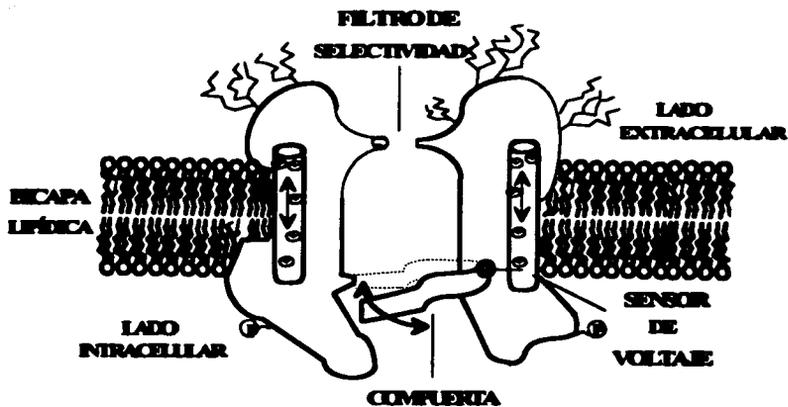


Fig. 3.- Modelo hipotético de un canal iónico. Es un poro hidrofílico que permite el flujo de iones a través de la bicapa. Contiene filtro de selectividad, compuerta, y sensor de voltaje. Algunos canales están glicosilados en el lado extracelular, y pueden contener sitios de fosforilación en el lado citoplásmico. Revisado en (59).

El fenómeno eléctrico surge cuando cargas de signos opuestos se separan y pueden moverse independientemente. A cualquier flujo neto de cargas se le llama corriente (I). Los flujos iónicos a través de los canales producen corrientes eléctricas que pueden medirse, la unidad de medida de la corriente es el Amperio (A). Considerando que un canal deja pasar del orden de 1×10^7 iones seg^{-1} y que $1 \text{ Coul} = 6.24 \times 10^{18}$ cargas elementales, entonces 10^7 iones $= 1.6 \times 10^{-12} \text{Coul}$. Sabemos que un Amperio corresponde al flujo constante de un Coul por segundo (Amperio = 1 Coul seg^{-1}). Por lo tanto la corriente que pasa a través de un solo canal iónico puede ser mayor de 1.6×10^{-12} Amperios es decir 1.6 picoAmperios (pA). Los sistemas actuales para la medición de canales son capaces de medir hasta fracciones de pA. Esto permite seguir la actividad de un canal (59 y 62). Por la convención de Benjamín Franklin la corriente positiva fluye en la dirección del movimiento de las cargas positivas, y una corriente eléctrica se dice que fluye desde el polo positivo al negativo. Al electrodo positivo se le llama ánodo y al electrodo negativo cátodo. Tomando esta convención los aniones fluyen hacia el ánodo y los cationes hacia el cátodo (62). El tamaño de la corriente se determina por la diferencia de potencial entre los electrodos y por la conductancia eléctrica de la solución que separa los electrodos. La diferencia de potencial entre dos puntos que están separados por un aislante es más grande que la diferencia entre dos puntos separados por un conductor. Una diferencia de potencial existe entre el interior y el exterior de las células. Esta diferencia se expresa como voltaje (V), ΔV ó E_m , y se mide en Volts. La diferencia de potencial a través de la célula que se conoce como potencial transmembranal, es típicamente de 30 a 90 mV negativos en el interior de la mayoría de células animales (64). Esto implica que el potencial cae desde estos valores a cero en el interior de la membrana, que es una zona hidrofóbica y de baja constante dieléctrica.

La conductancia eléctrica (G) es una medida de la facilidad para el flujo de corriente entre dos puntos, y se mide en siemens (S). El recíproco de la conductancia es la resistencia (R), se mide en ohms (ω). La corriente a través del canal generalmente obedece a la ley de ohm (62). Esta ley establece que: la corriente que pasa a través de un conductor es directamente proporcional a la fuerza electromotriz (voltaje), e inversamente proporcional a la resistencia $I = V/R$. La ley de ohm también puede escribirse en términos de conductancia: $I = G V$ (59). La conductancia se puede obtener sacando la pendiente de la curva I vs V , y es $\gamma = I / (E_m - E_i)$, donde E_m es el potencial transmembranal y E_i es el potencial de equilibrio del ión transportado el cual se puede

calcular con la ecuación de Nernst. Esta ecuación se revisará detalladamente en la sección de Métodos (59, 62 y 65).

Debido a que los canales son moléculas muy eficientes para el flujo de iones, deben estar finamente regulados; si realizaran su actividad de manera descontrolada podrían producir fácilmente muerte celular. En todos los tipos de canal el efector actúa sobre la compuerta del canal produciendo un cambio conformacional en la molécula que produce la apertura o cierre del poro. El cambio conformacional se puede inducir por cambios en el potencial de membrana, por la unión de un ligando o por estímulo mecánico. La probabilidad de que el canal esté abierto durante el tiempo total de registro se conoce como probabilidad de apertura (P_o). En los registros de canal único la P_o se puede obtener fácilmente y nos permite conocer los posibles efectores (59).

II.- ANTECEDENTES :

No obstante la riqueza de información que existe indicando la participación de canales iónicos en la fisiología del espermatozoide, es poco lo que se sabe de ellos. Esto puede deberse al tamaño reducido ($4 \times 2 \mu\text{m}$), a la forma elongada y a la movilidad del espermatozoide que hacen el registro electrofisiológico de ellos técnicamente difícil. Sólo pocos reportes se han publicado sobre la actividad de canal individual en el espermatozoide de mamífero. Un canal de conductancia de 130 pS en 0.1 M de NaCl se registró al agregar membranas que contenían una proteína parcialmente purificada de 110 kDa del espermatozoide de humanos, a bicapas lipídicas (40). Otros dos canales de Ca^{2+} teniendo conductancias de 10 a 20 pS y 50 a 60 pS se han descrito en bicapas formadas en la punta de un microelectrodo apartir de liposomas conteniendo membranas de espermatozoide de cerdo. El canal más pequeño se bloqueo parcialmente con nitrendipina y verapamil; y completamente con 0.5 mM de La^{3+} . Existe otro reporte de un canal catiónico no muy selectivo, independiente de voltaje de espermatozoide de cerdo, obtenidos ya sea de la cola del epidídimo o recientemente eyaculados. Dicho canal se bloquea por Verapamil (1 mM) y 50 μM de Nitrendipina y Rojo de Rutenio (15). Recientemente este mismo grupo obtuvo registros de un canal de 10 a 20 pS permeable a Ba^{2+} que se bloquea con μM de Dihidropiridinas (DHP). Aunque la dependencia de voltaje no es muy marcada se identificó como canal de Ca^{2+} tipo L, el cual podría participar durante la RA (68).

El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide es fundamental para que ocurra la RA, este fenómeno es dependiente de Ca^{2+} externo y parece ocurrir a través de canales iónicos específicos, ya que antagonistas de canales de Ca^{2+} inhiben el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la RA. Además, en fracciones de membrana plasmática de espermatozoides de toro y de carnero se han identificado sitios de unión de alta afinidad a la dihidropiridina PN200-110, que bloquea los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (67). Por otro lado, existen evidencias que sugieren la participación de por lo menos dos vías de transporte para Ca^{2+} durante la RA inducida por ZP, tanto en erizo (96), como en ratón (95). La primera vía produce elevaciones pequeñas y transitorias de Ca^{2+}_i en la zona de la cabeza del espermatozoide. Parece que esta vía no es dependiente de voltaje y es pobremente selectiva, ya que conduce otros cationes divalentes además del Ca^{2+} . El segundo canal media elevaciones de Ca^{2+}_i sostenido, y es farmacológicamente muy parecido a canales voltaje dependientes tipo L (95).

Se ha sugerido que la exocitosis acrosomal en el espermatozoide de mamíferos involucra segundos mensajeros y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (66). También hay evidencias que indican la participación de proteínas G en los mecanismos de transducción que disparan la RA, ya que tanto el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ como el de pH_i producidos durante la RA, son inhibidos por toxina pertusis (47). Reforzando lo anterior, se han encontrado en el espermatozoide de perro miembros de la familia de receptores olfatorios que están acoplados a proteínas G (26). El papel de estos receptores es desconocido pero podrían estar involucrados en la respuesta del espermatozoide a los componentes del óvulo, probablemente por quimotaxis.

También existe una referencia que apoya la presencia de un canal de K^+ activado por Ca^{2+} en el espermatozoide de hámster. Este canal se bloqueó con caribdotoxina y con Cs^+ . Ambos agentes inhibieron también la RA (17).

Se han encontrado canales de Cl^- en el espermatozoide de cerdo y carnero, que son análogos al receptor a GABA presente en neuronas del sistema nervioso central (23 y 47). Recientemente se reportó que la rápida respuesta en el espermatozoide humano inducida por progesterona, puede involucrar interacción de esteroides con un canal de Cl^- receptor de esteroides, parecido al receptor a GABA (47).

Recientemente también se demostró que el receptor de IP₃ (RIP₃) está presente en la

membrana acrosomal, aunque su posible participación en la RA inducida por la ZP, no está claro (22).

Fusionando fragmentos de membrana plasmática del espermatozoide de ratón a bicapas lipídicas, nuestro grupo detectó un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de conductancia alta (381 pS en 125 mM de KCl, 25 mM de BaCl_2). El canal permanece en el estado abierto a E_m negativos. Muestra subestados de conductancia a $E_m > 0$, y tiene una pobre relación de permeabilidad entre cationes divalentes y monovalentes ($P_{\text{Ba}^{2+}}/P_{\text{K}^{+}}=4$) (69). El canal de conductancia alta también se ha observado usando directamente espermatozoides en bicapas planas y es similar a un canal de Ca^{2+} que se registra al fusionar membrana plasmática o espermatozoides de dos especies de erizo de mar a bicapas planas (69). También se describió un canal parecido en membrana de espermatozoide de cerdo (15). Es interesante pensar que este canal puede ser importante en la fisiología del espermatozoide, ya que está presente en especies filogenéticamente tan distantes (69).

Recientemente nuestro grupo haciendo experimentos en bicapas planas, logró el registro de tres tipos de canales iónicos a partir de membranas purificadas del espermatozoide de ratón: uno de los canales es de conductancia grande (350 pS), selectivo a Ca^{2+} , se bloquea con Rojo de Rutenio en el rango μM y presenta subestados de conductancia. Este canal es muy parecido a uno previamente reportado por nuestro mismo grupo. Otro canal es de 103 pS, selectivo a cationes, presenta un subestado de 51 pS. Este canal, que es pobremente selectivo entre cationes monovalentes, se presentó algunas veces con mucha actividad (P_o alta), y otras con muy baja actividad (P_o baja). Por último se detectó otro canal selectivo a aniones de 81 pS con alta P_o (78).

Como mencionamos anteriormente la forma y tamaño del espermatozoide maduro hacen difícil el estudio electrofisiológico directo de sus canales. Aunado a esto, es una célula completamente diferenciada que carece de maquinaria para la síntesis de proteínas. Esto nos hace pensar que los canales presentes en la célula madura se procesaron durante la espermatogénesis. Por todo lo anterior, nuestro grupo decidió estudiar al espermatozoide en etapas más tempranas de su biogénesis, donde aún contiene maquinaria de síntesis y las células son de mayor tamaño. Esto nos dio la posibilidad de hacer experimentos electrofisiológicos y de biología molecular de los que obtuvimos valiosos resultados. Recientemente encontramos evidencias de que el gene

α_{1E} , y un poco menos α_{1A} , que codifican para la subunidad α de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, se expresan de manera importante en células espermatogénicas (93). Reforzando el resultado anterior, las únicas corrientes que se encontraron en estas células son de bajo umbral, cinética rápida e inactivantes. Estas corrientes obtenidas en experimentos de "patch clamp", presentan activación e inactivación parecida a canales tipo T (93 y 94). Además estas corrientes se bloquearon por Dihidropiridinas reversiblemente con un $IC_{50} = 8.1 \mu M$ y con Ni^{2+} externo ($IC_{50} = 150 \mu M$). También se reportó que este canal tipo T se bloquea por Pimazida $1 \mu M$ y Amilorida $0.5 mM$. Estos compuestos son conocidos antagonistas de corrientes T en células somáticas. La RA se bloquea con estos 4 compuestos y a estas concentraciones en espermatozoides de ratón (93 y 94).

III.- OBJETIVOS

1.- Estudiar la interacción del espermatozoide completo de ratón con bicapas lipídicas planas mediante la incorporación de canales iónicos. Las bicapas son detectores muy sensibles de canales individuales, por lo que la interacción del espermatozoide y la bicapa, medida a través de la incorporación de canales iónicos a ésta, es un nuevo modelo para el estudio de la interacción entre gametos. Esta estrategia permite estudiar los canales de células muy pequeñas, difíciles de estudiar por "patch clamp", además quizá permita estudiar algunos de los mecanismos de fusión.

a).- Determinar la relación entre la RA y la incorporación de canales.

Sabemos que después de la RA la membrana del espermatozoide se vuelve más fusogénica (20 y 4). Sospechamos que durante la transferencia de canales suceden eventos de fusión. Por lo anterior probamos si el % de RA influye en la eficiencia de la incorporación de canales a la bicapa.

b).- Caracterización general de los canales incorporados:

b.1) Conductancia.

b.2) Selectividad.

b.3) Dependencia al Voltaje.

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS:

IV.1.- MATERIAL BIOLÓGICO:

Los espermatozoides se obtuvieron de ratones CD-1 mayores de 16 semanas realizando el siguiente protocolo.

- 1.- Sacrificio del ratón mediante luxación de la vértebras cervicales.
- 2.- Extracción de los espermatozoides de la cola del epidídimo, haciendo disección del testículo y epidídimo.
- 3.- Dilución y agitación suave en 1.5 ml de medio M-199 (Merk) pH 7.4 para permitir que los espermatozoides salgan de los conductos del epidídimo.
- 4.- Se deja sedimentar durante 5 minutos.
- 5.- Se recolectan solo 0.8 ml de la superficie logrando con esto obtener los espermatozoides de mejor movilidad.
- 6.- Se capacitan durante 60 min a 37°C, en medio M-199 (sigma)
- 7.- Coordinado con el paso anterior se prepara un gradiente de Percoll al 50% (1 ml de Percoll, 0.2 ml de medio de Green 10X y 0.8 ml de agua destilada; se centrifugan a 12000 G por 25 min. De esta manera el gradiente está listo cuando la capacitación de las células termina.
- 8.- Se extrae 0.6 ml de los espermatozoides capacitados, se colocan con cuidado en el gradiente previamente formado y se centrifugan a 325 g por 10 min.
- 9.- Se forma una banda bien definida de espermatozoides aproximadamente a la mitad del tubo. Estos espermatozoides se tratan de recuperar en su totalidad y con mucho cuidado, para no destruir el gradiente. Se debe evitar sacar más de 0.5 ml de volumen, por que si tomamos más volumen se obtiene más Percoll que células.
- 10.- Los espermatozoides así obtenidos se lavan en 1.5 ml de medio de Green 1X a 300 G por 5 min.
- 11.- Se resuspende en medio de Green y se toma una muestra para contar las células.
- 12.- Se hace la dilución necesaria para tener de 1-3 X 10⁶ células/ml.
- 13.- Se hacen dos alícuotas una con 1.5 mM de Ca²⁺ y otra sin este.
- 14.- La alícuota sin Ca²⁺es para manejar condiciones de baja RA, y se prueba primero en la bicapa.
- 15.- La alícuota con Ca²⁺se deja para inducirle la RA con 15 µM del ionóforo A23187.

16.- Antes de probar las células en las bicapas se toma una muestra y se fija en formaldehído al 10 % para posteriormente contar el % de RA. Esto se hace también al finalizar el experimento, para ver cuanto aumenta la RA a través del tiempo.

a)- Ventajas del uso del Percoll para centrifugar con gradientes de densidad:

El Percoll está formado de partículas de sílice coloidal de 15-30 nm de diámetro cubierto con polivinil pirrolidona (PVP). Puede formar gradientes en el rango 1-1.3 gr/ml, y es completamente atóxico para las células. Por tener una muy baja presión osmótica forma gradientes de densidad que no afectan osmóticamente a las células, y por su baja viscosidad la separación de las células se hace fácil y con cierta rapidez (71).

IV.2.- PREPARACIÓN DE LA CÁMARA Y DEL MATERIAL DE VIDRIO UTILIZADO:

Durante los experimentos se utilizaron para trabajar tres diferentes copas hechas de teflón, las cuales se lavaban rigurosamente con un detergente líquido, friccionando con algodón; se dejaban enjuagando durante toda la noche al chorro de agua. Al otro día se lavaba abundantemente con agua destilada y con etanol absoluto, secándose con un chorro constante de gas Nitrógeno. Después se almacenaban en un recipiente protegido del polvo hasta su uso.

El material de vidrio usado para la preparación y almacenamiento de soluciones y los filtros, previamente lavados y secos, se volvían a lavar antes de su uso bajo el siguiente protocolo:

- 1.- Tres veces con agua bidestilada.
- 2.- Dos veces con agua tridestilada.
- 3.- Una vez con etanol absoluto y se dejaba secar a temperatura ambiente.
- 4.- Los portafiltros se lavaban después de cada uso y además esterilizaban cada dos semanas en autoclave.

Las puntas de las pipetas que se usaron siempre eran nuevas y se guardaban debidamente protegidas del polvo.

IV.3.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Las soluciones que se utilizaron en todos los experimentos se realizaron con reactivos de alta pureza y con agua tridestilada. Después de tener las soluciones a las concentraciones y pH deseados, se filtraban en membranas de papel para filtrar con poros de 0.2 μm de diámetro.

Posteriormente se almacenaban a 4 °C hasta su uso, además durante el experimento las soluciones se mantenían en un termo con hielo.

IV.4).- PRETRATAMIENTO DE LA CÁMARA:

Una vez que se tiene limpia la copa donde se pintará la bicapa, se le debe hacer un tratamiento antes de utilizarla. Este "pretratamiento" consiste en lo siguiente: 1.- aplicar una gotita de lípido sobre el agujero. Este paso es importante debido a que si ponemos lípido en exceso, las bicapas que se forman tienen capacitancias muy bajas, lo que significa que son gruesas. Esto afecta por que cuando un canal se incorpora no atraviesa la bicapa, y como consecuencia no puede conducir.

2.- El lípido se seca con un flujo suave de gas Nitrógeno durante 3-5 min, esto se hace para evitar que el lípido se oxide. El flujo es suave para que el lípido permanezca sobre el agujero cuando se seca.

IV.5).-PREPARACIÓN DE BICAPAS:

Los lípidos al estar en contacto con el agua, y por sus características anfipáticas tienden a formar ciertas estructuras definidas. Las moléculas de lípidos se acomodan de tal forma que orientan sus cabezas polares hacia el agua, y "esconden" sus colas hidrofóbicas. La geometría final depende del tipo de lípidos, y su concentración en el agua. Ellos pueden formar bicapas, liposomas y micelas (72). Una bicapa lipídica se define como una capa doble de lípidos en un ambiente hidrofílico, que se acomodan dejando las colas de ac. grasos de una capa en contacto con las de la otra, para protegerse de la fase acuosa, y dejando sus cabezas hidrofílicas en contacto con el agua Fig 4 (72). Desde hace tiempo se ha utilizado la técnica electrofisiológica de bicapas lipídicas planas como herramienta para estudiar los mecanismos moleculares que regulan los canales iónicos. Estos experimentos se han realizado principalmente a través de la reconstitución de canales en membranas y logrando su incorporación en bicapas lipídicas planas (70). Con esto se logra aislar la molécula de un solo canal, del resto de la maquinaria celular para facilitar su estudio. Las bicapas lipídicas planas es una técnica electrofisiológica muy poderosa por que provee la posibilidad de controlar el tipo de soluciones a ambos lados de la bicapa, el contenido de lípidos de la misma, permite medir la corriente que pasa a través del canal ya sea corrientes macroscópicas o corrientes unitarias, se pueden poner fácilmente segundos mensajeros sustancias que puedan modular la actividad del canal (59). Las bicapas son

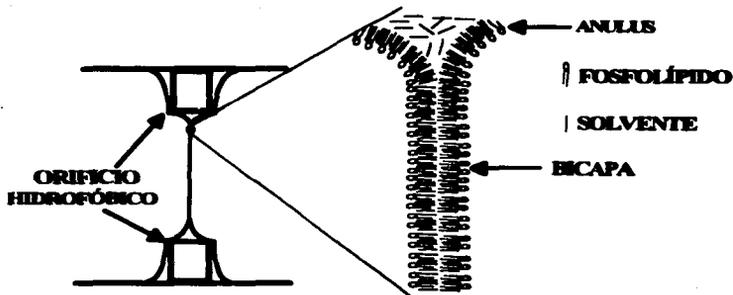


Fig. 4 .- Formación de la bicapa .- Aquí se muestra cómo se forma la bicapa en el poro hidrofóbico. Una vez colocada la dispersión de lípidos y solvente en el orificio, forma una capa que se empieza a adelgazar hasta que las monocapas que están en contacto con la solución acuosa hacen contacto, esto da lugar a una bicapa lipídica. Se puede ver cómo el solvente migra hacia el anulus. En el lado derecho se observa una amplificación de la región de contacto entre la bicapa y el poro.

detectores muy sensibles a canales individuales. Esta estrategia permite estudiar los canales de células muy pequeñas, difíciles de estudiar por "patch clamp". Las bicapas se hacen en una cámara de teflón con dos compartimentos llenos de solución y con una capacidad de 3 ml en *cis* y 2.5 ml en *trans*, uno de los compartimentos tiene un agujero de 200 a 300 μm , es aquí donde se pinta la bicapa que separa los dos compartimentos acuosos. Con estos diámetros en los agujeros se logran bicapas de 200-350 pF de capacitancia. Por convención al compartimento donde se depositan las membranas o células y se aplica el voltaje se le llama *cis*. El otro lado se le llama *trans*, y está conectado a un convertidor corriente-voltaje y a tierra. Para conectar los compartimentos de la cámara con el sistema electrónico, se emplean puentes de agar al 2 % sumergidos en solución 2 M de KCl, para disminuir la posibilidad de que se formen potenciales de unión líquida (64 y 72). La corriente debe transformarse desde un flujo de electrones en el alambre a un flujo de iones en solución, para esto se utilizan electrodos reversibles de Ag/AgCl (64). El lípido que se utiliza es diftanoilfosfatidilcolina dispersa en n-decano (20 mg./ml). Es un lípido neutro, y de origen sintético que se caracteriza por ser muy fusogénico y difícilmente oxidable por que carece de dobles enlaces en sus cadenas hidrocarbonadas.

Una vez conectada la cámara adecuadamente, con una punta de pipeta recortada se aplica un poco de lípido en el poro para formar una bicapa ("se pinta"). A través de los aparatos se sigue el estado de la bicapa, particularmente con el osciloscopio mediante la emisión de un pequeño pulso cuadrado, fig 5. Principalmente se observa la capacitancia (C), debido a que este parámetro nos puede indicar el espesor de la bicapa (la capacitancia es directamente proporcional al área de la membrana e inversamente proporcional a la distancia que separa las dos capas que forman la bicapa). Una vez que se tenga una bicapa estable con una capacitancia de al rededor a 250 pF se procede a darle pulsos de voltaje de ± 100 mV para probar que no tuviera "artefactos". Sólo si se obtenía una bicapa sin "artefactos" se iniciaba el experimento. Cabe mencionar que le llamamos "artefactos" cuando en la bicapa se produce actividad espontánea de canales. Esto puede deberse a varias causas: por contaminación de las soluciones, del lípido, por lavar mal el poro, etc.

Una bicapa delgada se ve oscura a simple vista debido a que refleja poca luz, esto se debe a que el espesor de la bicapa llega a ser menor que la longitud de onda de la luz visible (2.5-5 nm.). Por lo anterior con frecuencia se les llama bicapas negras (70 y 101).

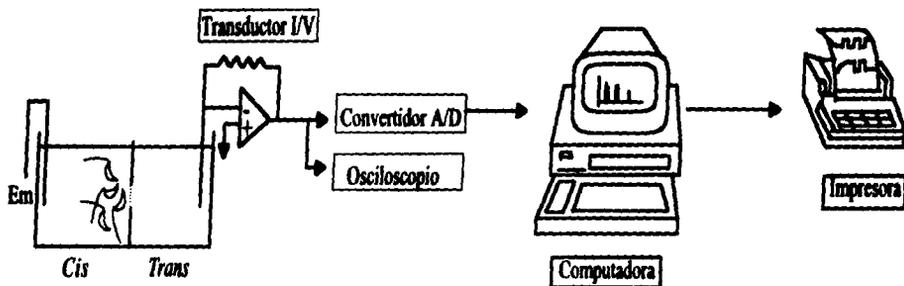


Fig 5.- Descripción del sistema : Incorporación de canales iónicos utilizando células. Se depositan de 2-4 μ l de espermatozoides muy cerca de la bicapa en condiciones que promueven la incorporación de canales. La corriente que pasa a través de un canal incorporado en la bicapa, se amplifica con la ayuda de un amplificador operacional (se simboliza con un triángulo en el diagrama). La señal producida por el canal pasa por la resistencia de retroalimentación, conectada en la entrada inversora, signo negativo, y en la salida del amplificador operacional, generando una corriente de igual magnitud pero con signo contrario a la que produjo el canal. Esta corriente regresa a la bicapa con lo que se mantiene el experimento en condiciones de fijación de voltaje. La señal también se capta en un osciloscopio; en la pantalla de este aparato podemos seguir la formación de bicapas midiendo el incremento de la resistencia eléctrica y de la capacitancia asociada, mediante la aplicación de un pulso cuadrado pequeño en la cámara. También podemos observar la actividad de los canales incorporados. Para que la señal analógica (señal real) sea interpretada por la computadora y la información pueda almacenarse para su análisis, es necesario digitalizarla (73). Para esto el equipo cuenta con un convertidor analógico digital (A/D). Los registros que se almacenaron en la computadora se analizan con el programa pClamp 6 (Axon Instruments, Inc). Los trazos de los canales interesantes se seleccionan e imprimen para continuar con el análisis.

IV.6).- ELABORACIÓN DE PUESTOS DE AGAR:

Los puentes de agar se elaboraron con pipetas Pasteur de vidrio que tienen un diámetro interno de 1.4 mm. Los capilares de vidrio se doblaron con calor dándoles una forma de "U" y se cortaron con un lápiz de punta de diamante, quedando con una longitud de ~ 2.5 cm. Después sellaban con agar caliente al 2% en solución con KCl 2M evitando la formación de burbujas de aire. Posteriormente los puentes se enfriaban, se limpiaban y se almacenaban en solución de KCl 2M a 4°C. Los puentes de agar contribuyen a evitar que se formen diferencias de potencial entre los dos electrodos. Estas diferencias conocidas como potenciales de unión líquida, se forman cuando los electrodos están en contacto con soluciones de diferente concentración (72).

IV.7).- PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS:

De los electrodos que se usan en experimentos electrofisiológicos, los más comunes son los Ag/AgCl, que consisten de alambres de Ag cubiertos con AgCl (64). Para preparar los electrodos se siguió el siguiente protocolo: 1.- A una pila de 1.5 Volta tamaño C se le soldó en el polo negativo una resistencia variable, a su vez la resistencia tenía conectado un alambre cuyo extremo libre era de plata. En el polo positivo se soldó un alambre con un caimán en el otro extremo. 2.- En un vaso de precipitado se coloca aproximadamente 25 ml de una solución de HCl 1M en la que se sumerge el alambre de plata que está soldado a la pila. 3.- en el caimán se coloca el electrodo de plata que va a clorurarse, el cual debe estar totalmente limpio y enrollado formando un espiral, esto con la finalidad de aumentar la superficie de contacto. El electrodo también se sumerge en la misma solución. 4.- Poco a poco se va abriendo la resistencia variable hasta que empiezan a producirse burbujas en el alambre de plata que está soldado. De esta manera el Cl empieza a fluir hacia el electrodo para reaccionar y formar una película de AgCl que paulatinamente lo va recubriendo. Este proceso se realiza durante 15 min aproximadamente. El electrodo ya clorurado toma un color casi negro. Cuando un electrodo empieza a verse de color grisáceo o con manchas claras es señal de que debe volverse a clorurar. Esto sucede porque con el uso la capa de AgCl se va desgastando, por esta razón los electrodos se deben clorurar con cierta frecuencia. Este tipo de electrodos funciona reversiblemente, es decir si los electrones fluyen desde el alambre de cobre hacia la película de AgCl a través del alambre de plata, el AgCl se separa en átomos de Ag y el ion Cl⁻ se hidrata entrando en solución. Si los electrones fluyen

en la dirección contraria los átomos de Ag que están en el alambre de Ag donan un electrón por átomo y se combinan con iones Cl^- que están en la solución para formar AgCl .



Por lo anterior se les conoce como electrodos reversibles ya que la corriente puede fluir en ambas direcciones (64).

IV.8).- TIPOS DE SOLUCIONES UTILIZADAS:

Durante los experimentos se utilizaron las siguientes soluciones y medios:

Solución I : KMeSO_4 , 100 mM; EGTA, 2 mM; Hepes-K 5 mM; pH 7.4 . Esta solución se utilizó para pintar la bicapa en condiciones simétricas.

Solución II : NaCl , 140 mM; CaCl_2 , 2 mM; KCl , 4 mM; Hepes-Na, 5 mM; pH 7.4 . La segunda solución se utilizó cuando se depositaban las células.

Solución III : BaMeSO_4 , 50 mM; Hepes, 5 mM; pH 7.4 . Utilizada para probar si el canal transferido transportaba cationes divalentes.

Medio de Green.- Contiene: NaCl , 140; KCl , 4 mM; Glucosa, 10 ; Hepes 25 mM; pH, 7.4 .

Medio M-199 (Sigma).- Contiene las siguientes sales: NaCl , 109; NaHCO_3 , 10; KCl , 4.77; KH_2PO_4 , 1.19; MgSO_4 , 1.19; CaCl_2 , 1.7; Hepes, 25 mM; Lactato de Na 3.7 $\mu\text{l/ml}$ (60%); Glucosa 1 mg/ml. Además está enriquecido con albúmina, amino ácidos y vitaminas; pH, 7.4 .

IV.9).- SISTEMA DE PERFUSIÓN:

La perfusión consiste en cambiar la solución de alguno de los compartimentos de la cámara, generalmente en *cis*; pero manteniendo el volumen constante. Durante los experimentos se perfundía en dos ocasiones. Primero se pintaba la bicapa en condiciones simétricas con la solución I, posteriormente se perfundía con la solución II para agregar las células. Cuando un canal se incorporaba se registraba para luego volver a perfundir con la solución III . Para que el cambio de soluciones fuera eficiente se hacía con 8 a 10 veces el volumen contenido en el lado *cis*, y lentamente para no romper la bicapa. La fig 7 muestra el sistema de perfusión utilizado. Las jeringas y mangueras del sistema se cambiaban cada 2 semanas y diariamente se lavaban de la siguiente manera: al terminar el experimento, tres veces con agua tridestilada y dos veces con etanol absoluto. Al iniciarlo, dos veces con agua tridestilada y una con etanol absoluto.

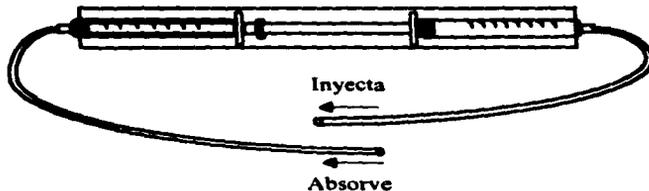
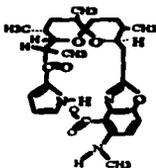


Fig 6.- Dibujo esquemático del sistema de perfusión utilizado. Mientras una jeringa inyecta la solución que se va a perfundir, la otra va absorbiendo casi en la misma proporción. Con esto se diluye la solución original hasta eliminarse. Este dispositivo mantiene el volumen de la cámara casi constante.

IV. 10.- CUANTIFICACIÓN DE LA RA (Tinción de Coomassie).-

Las células se fijan en formaldehído al 10 %, y se guardan para al siguiente día contar el % de RA bajo el siguiente protocolo: 1.-centrifugar a 500G x 3 min y resuspender en 20 μ l de PBS, 2.- colocar la muestra de células en un porta objetos para enseguida secarla con una pistola de aire, 3.- teñir en Azul de Coomassie durante ~ 2 min, 4.- lavar con PBS para eliminar el exceso de colorante, 5.- agregar ~ 8 μ l de una solución de PBS + glicerol en proporción 1:1 sobre la tinción, y además colocar un cubre objetos con lo que queda lista la muestra para observarse. La cuantificación de la RA se hizo en un microscopio óptico utilizando el objetivo x100 tanto en contraste de fase como en campo claro. Se contaron 200 células por muestra con lo que se calculó el % de RA de manera confiable. A los espermatozoides se les indujo la RA con 15 μ M del ionóforo de Ca^{2+} A23187, y se contó tanto al inicio (10 min después de poner el ionóforo) como al finalizar el experimento. El acrosoma de las células no reaccionadas se tiñe claramente, por lo que es fácil distinguirlos de las reaccionadas en las que el acrosoma ya no aparece, fig 1B. Las condiciones de baja RA consistieron en poner a las células en cero Ca^{2+} y con 4 mM de EGTA. La solución de PBS contiene las siguientes sales: NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM; NaH_2PO_4 , 12.5 mM; KH_2PO_4 , 1.4 mM.

a)



b)



Fig 7.- A23187.- Es un ionóforo que intercambia dos H^+ por cada catión divalente a través de la membrana. Es más selectivo para el Ca^{2+} que para otros cationes divalentes. Dos moléculas del ionóforo cubren a un catión para atravesar la membrana. Esto se puede hacer porque posee una superficie hidrofóbica. Este movimiento de iones se realiza obedeciendo el gradiente electroquímico del Ca^{2+} (74 y 75) a).- Fórmula estructural del A23187 b).- Diagrama esquemático de cómo actúa un acarreador del tipo A23187.

IV.12.- ESTUDIO DE LOS CANALES INCORPORADOS EN LA BICAPA.-

Quando se incorpora un canal iónico en la bicapa, los eventos de apertura y cierre del mismo son evidentes al aplicar una diferencia de potencial transmembranal, en experimentos en los que se usan soluciones simétricas (i.e.: soluciones de la misma composición iónica a ambos lados de la bicapa). También es evidente sin aplicar voltaje cuando se utilizan soluciones con diferente concentración iónica (gradiente). La apertura del canal se distingue como un salto súbito en la corriente que pasa a través de la bicapa, el canal permanece en el estado abierto por un cierto tiempo y se cierra. Cuando se aplica un potencial positivo, la corriente que pasa a través del canal abierto en función del tiempo es positiva y se detecta como un salto hacia arriba. Cuando se aplica un potencial negativo la corriente es negativa y se observa como un salto hacia abajo. Sin embargo si estamos cerca del potencial de inversión, E_r , (valor del potencial donde la corriente neta es cero), no habrá fluctuaciones debido a que están en equilibrio los iones que fluyen hacia un lado y otro del canal, por lo tanto la corriente neta es cero. Esto depende de la selectividad del canal y de las concentraciones iónicas presentes a ambos lados de la bicapa. Para encontrar el E_r de un ion "A" se puede utilizar la ecuación de Nernst [revisado en (62)]:

$$E_r = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A]_{\text{trans}}}{[A]_{\text{cis}}}$$

Donde :

R = Constante de los gases (8.315 V C K⁻¹ mol⁻¹)

T = Temperatura absoluta

F = Constante de Faraday (9.648 x 10⁴ C mol⁻¹)

z = Valencia del ion

[A]_{in} = Concentración del ion dentro

[A]_{out} = Concentración del ion fuera

IV.12 a).- Selectividad:

La selectividad es una característica importante de los canales, por que es esencial para la célula que posea diferentes canales iónicos que sean selectivos para diferentes iones. Sin embargo no existen canales que sean perfectamente selectivos (revisado en 62). Además, el ión que conducen mejor en condiciones fisiológicas es la base para la nomenclatura de los canales iónicos. Cuando un canal es muy selectivo para cierto ion el potencial de inversión del canal es muy parecido o igual al potencial de equilibrio de ese ion. En este trabajo encontramos la selectividad entre cationes monovalentes calculando los rangos de permeabilidad en condiciones biológicas de acuerdo a una variante de la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz, (revisado en 62):

$$P_{Na_{\text{civ}}}/P_{K_{\text{trans}}} = [K^+] / [Na^+] e^{(-E_r zF/RT)}$$

donde: E_r, es el potencial de reversión del canal

P, son las permeabilidades de los diferentes iones.

También observamos qué tipo de corriente producía el canal cuando no se le aplicaba voltaje a la bicapa, en esta situación la fuerza electromotriz la aporta el gradiente electroquímico de las soluciones, dependiendo de las concentraciones de estas, se puede determinar si el canal es aniónico o catiónico.

IV.12 b).- Conductancia.- El valor de la conductancia de un canal en condiciones iónicas definidas es una característica constante del mismo. Esto sirve como parámetro para identificarlo y detectar su presencia en un experimento. Para obtener la conductancia de un canal iónico se deben aplicar diferentes potenciales eléctricos a través de la bicapa, se grafica el tamaño de los

saltos de corriente con respecto al voltaje aplicado. La pendiente de la curva determina la conductancia unitaria (γ). El punto donde la curva cruza el eje de las X indica el Er del canal, que es el punto donde la corriente cambia de signo.

V.- RESULTADOS :

V.1.- REACCIÓN ACROSOMAL.-

Durante los experimentos probamos células manejadas en condiciones de alta, media, baja y muy baja RA. Esto con la finalidad de explorar la posible relación entre este fenómeno excitotóxico, y la eficiencia en la incorporación de canales iónicos a la bicapa. La RA se indujo con 15 μM de A23187, y se midió utilizando el método de tinción con azul de Coomassie, descrito en la sección de Métodos. Los resultados que se obtuvieron tanto induciendo la RA como en el control (RA espontánea), los clasificamos en cuatro grupos: 1) $14 \pm 4 \%$, $n = 6$; 2) $26 \pm 5 \%$, $n = 19$; 3) $46 \pm 6 \%$, $n = 13$; 4) $78 \pm 9 \%$, $n = 47$. Las células control después de capacitarlas se manejaron en 0 Ca^{2+} .

V.2.- EXPERIMENTOS CON BICAPAS.-

Como se mencionó en la sección de Métodos, los experimentos se realizaron sólo en bicapas estables (capacitancia constante de $\sim 250 \text{ pF}$, y 1-2 pA de ruido, filtrando a 200 Hz.). Primero se hacía el control para descartar que la bicapa tuviera transiciones de corriente antes de agregar las células. Un ejemplo de estos controles se ilustra en la fig 8A) donde el trazo superior representa 2 seg y el trazo inferior es una expansión de la escala de tiempo del mismo (500 mS). Las bicapas que tenían fluctuaciones de corriente previo a las células no se utilizaron. También se hicieron controles agregando a la bicapa la cantidad de A23187 que se usó para inducir la RA. En esta condición no se observaron canales, $n = 10$. Con la finalidad de descartar que los canales que registramos provinieran de vesículas, posiblemente formadas durante el experimento, realizamos un control al final de algunos días en los que habíamos obtenido incorporación. Este control se hizo bajo el siguiente protocolo: 1.- centrifugar las células a 5000 g durante 10 minutos; 2.- Se forma un pellet de células, recuperar el sobrenadante y probarlo en una bicapa nueva utilizando cámara y copa diferentes. En todos los controles no se obtuvo actividad de canales significativa, aunque se usaron hasta 15 μl de sobrenadante por adición y varias adiciones, $n = 11$.

En comparación con todos los experimentos usando espermatozoides, se logró la incorporación de canales agregando de 2-4 μl de células y con 3-8 adiciones. Estos controles demuestran que los registros que obtuvimos provenían efectivamente de canales del espermatozoide.

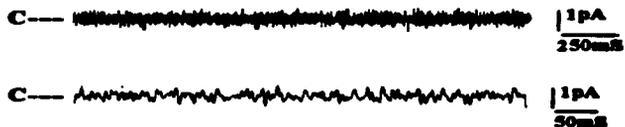
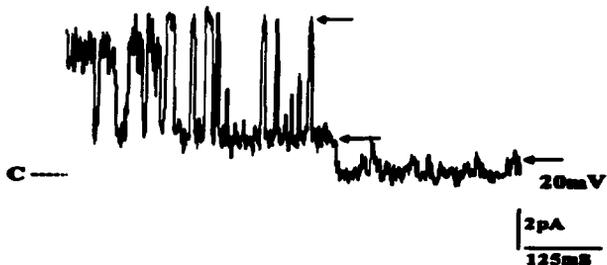
A)**B)**

Fig 8.- A) Registro normal de una bicupa sin actividad de canales. El ruido que registra es de aproximadamente 1 pA . Sólo se usaron para los experimentos las bicupas que presentaron condiciones semejantes. El trazo superior abarca 2 seg y el inferior 500 mS **B).**- Una bicupa con al menos tres tipos de transiciones. Este tipo de incorporaciones múltiples predominó en la transferencia de canales del espermatozoide a la bicupa. Las flechas indican los niveles de corriente de cada transición, la letra C indica el nivel del estado cerrado y a la derecha el potencial con el que se obtuvo el registro y la escala. La corriente en los trazos mostrados se filtró a 200 Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.).

Pudimos comprobar que si es posible lograr la incorporación de canales iónicos a bicapas lipídicas planas utilizando espermatozoides completos, como se había reportado previamente por nuestro grupo (69). Nuestros resultados muestran que la eficiencia en la incorporación de canales va aumentando considerablemente a medida que incrementa el % de RA. Con los espermatozoides del grupo 1) se obtuvo una eficiencia del 17 % (1/6), con el grupo 2) 47 % (9/19), en el 3) 77% (10/13). Y en el grupo 4) de alta RA, se obtuvo una eficiencia del 91 % (43/47 experimentos). Ver Fig. 9. El % de RA también influyó en el tiempo que tardó en obtenerse las incorporaciones, 15-35 min en las células con alta y mediana RA y 40-60 min en las de baja RA. Transcurridos más de 60 min ya no se logró incorporación de canales en ninguna de las dos condiciones.

Por otro lado la concentración de células con las que trabajamos influyó en nuestros resultados. Encontramos que 1-3 $\times 10^6$ células / ml funcionan bien, es decir se obtiene transferencia de canal con más facilidad. Mayores concentraciones de células resultaban en incorporaciones múltiples que producían corrientes difíciles de analizar. De la misma manera concentraciones menores disminuyeron considerablemente la eficiencia de incorporación.

En las condiciones de media y alta RA la movilidad variaba de 3 - 12 %, y en baja RA de 14 -18 %. Esta movilidad del espermatozoide no parece contribuir significativamente a la transferencia de canales. Sin embargo cuando además de alta o mediana RA se obtenía buena movilidad (>12 %), la incorporación se hacía ligeramente más eficiente, reduciendo el tiempo en que se incorporaba un canal. Por otro lado se hicieron 5 experimentos sin someter los espermatozoides al gradiente de Percoll, y además sin reaccionar. Bajo estas condiciones las células tenían una movilidad (> 30 %); sin embargo no se logró incorporación en ninguno de los experimentos. Además notamos que la movilidad de los espermatozoides disminuye de manera importante después de centrifugarlos en el gradiente de Percoll (60 % antes y 15 % después).

En estos experimentos detectamos la incorporación de diferentes tipos de canales iónicos, y fue común lograr (83%) incorporaciones múltiples (más de un tipo de transición por bicapa). La fig 8B ilustra un trazo de una bicapa con este tipo de incorporaciones, en él se notan al menos tres tipos distintos de transiciones. Sólo de la transición lenta (nivel de en medio) tenemos registros donde aparece independiente de las otras dos conductancias por lo que podríamos pensar que es un canal y no un subestado.

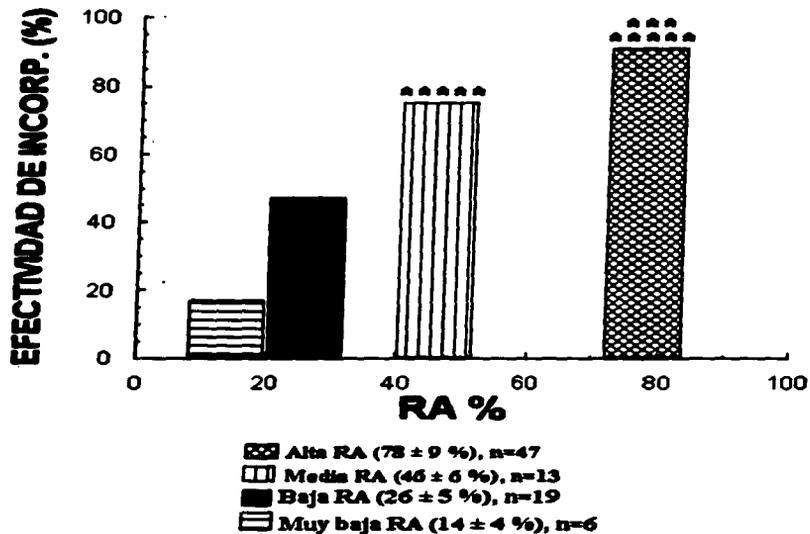


Fig. 9.- Efectividad en la incorporación de canales con respecto al % de RA. Vemos claramente que la incorporación se va haciendo más eficiente conforme el % de RA aumenta. Los asteriscos sobre las barras señalan el grupo al que pertenecían los espermatozoides de los que obtuvimos los registros presentados en los resultados.

V.3.- TIPOS DE CANALES INCORPORADOS :

La mayoría de los canales que logramos registrar fueron catiónicos con diferentes conductancias, pobre rango de selectividad entre cationes monovalentes, y de naturaleza óhmica; es decir que la relación entre la corriente que pasa a través del canal y la diferencia de potencial en la bicapa era directamente proporcional.

También se lograron ver canales que permanecían activos por cortos períodos no mayores de un minuto, por lo que no fue posible registrarlos. Debido a que estos canales aparecen y rápidamente desaparecen les llamamos "canales A-D". Este tipo de canales se vieron en seis ocasiones y todos provenían de espermatozoides manejados bajo condiciones de alta RA. Es probable que se trate de canales regulados por algún segundo mensajero, y por esta razón pierden su actividad ("se lava el mensajero").

A continuación presento la descripción y los registros de los canales que obtuve con mayor frecuencia, los que se diferenciaron con base en su selectividad, conductancia y voltaje dependencia. El valor de la conductancia de un canal en condiciones iónicas definidas es una característica constante del mismo. Esto sirve como parámetro para identificarlo y detectar su presencia en un experimento.

La tabla I contiene datos de los 5 tipos de canales que encontramos con más frecuencia.

a).- Canal de Ca^{2+} de alta conductancia .- Logramos la incorporación de un canal voltaje dependiente que conduce Ba^{2+} y presenta subestados de conductancia. La fig 10 muestra trazos de este canal que se abre rápidamente al dar el pulso de voltaje, en seguida se va relajando hacia subestados de menor tamaño tendiendo a cerrarse. En la fig 11-A), podemos ver la curva I/V del estado de mayor conductancia y en 11-B) la curva I/V de los subestados. Bajo las siguientes condiciones iónicas: NaCl , 140; KCl , 4; CaCl_2 , 2 mM en cis y en trans BaMeSO_4 , 50 mM, el canal presenta una conductancia máxima de 333 pS y un $E_r = 14.3$ mV teniendo baja relación de permeabilidad $P_{\text{Ba}}/P_{\text{Ca}} = 10$, valor cercano al reportado anteriormente. En este canal logramos distinguir por lo menos 5 subestados en los voltajes donde el canal tiene más transiciones (voltajes negativos). En la fig 12 se presentan histogramas de amplitud de la corriente donde se distinguen los diversos subestados con la conductancia de cada uno. La fig 13 muestra la curva de probabilidad de que el canal se encuentre en el estado de mayor conductancia (P_{M}) con respecto

TABLA I.-

TIPO DE CANAL	CONDUCTANCIA γ pS.	E _r mV	RELACION DE PERMEABILIDAD	CONDICIONES IONICAS	n =
Ca ²⁺	333	14.3	$P_{Ba}/P_{Na} = 10$	Cis: NaCl, 140; KCl, 4; CaCl ₂ , 2 Trans: BaMeSO ₄ , 50 mM	2
CATIÓNICO	164 ± 10	3.5 ±2.5	$P_K/P_{Na} = 1.6$	Cis: NaCl, 140; KCl, 4; CaCl ₂ , 2 Trans: KMeSO ₄ , 100 mM.	3
CATIÓNICO	96 ± 5	-14.5 ± 2.5	$P_{Na}/P_K = 1.26$	Cis: NaCl, 140, KCl, 4, CaCl ₂ , 2, mM /Trans: KMeSO ₄ , 100mM.	3
CATIÓNICO	33 ± 1	-14 ± 3.8	$P_{Na}/P_K = 1.26$	Cis: NaCl, 140, KCl, 4, CaCl ₂ , 2, mM /Trans: KMeSO ₄ , 100mM.	3
CATIÓNICO	21	6.5	$P_K/P_{Na} = 1.8$	Cis: NaCl, 140, KCl, 4, CaCl ₂ , 2, mM /Trans: KMeSO ₄ , 100mM.	2

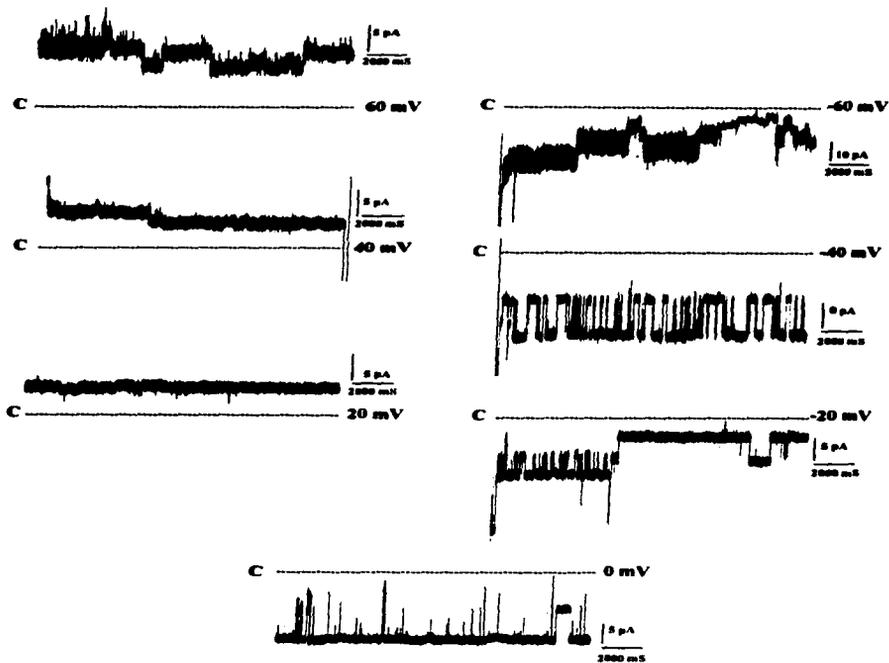
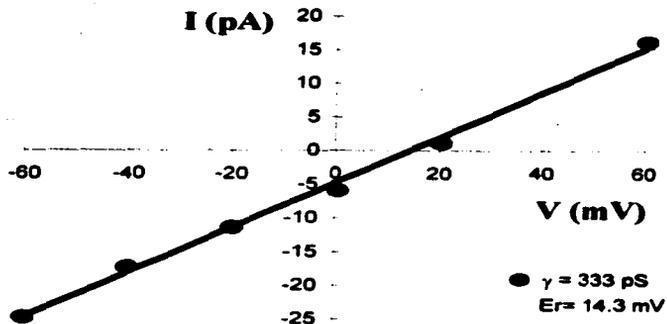


Fig 10.- Registros del canal de Ca^{2+} de alta conductancia. Estos trazos se obtuvieron bajo las siguientes condiciones iónicas: NaCl , 140; KCl , 4; CaCl_2 , 2 mM en cis y BaMeSO_4 , 50 mM en trans. Este canal presenta una conductancia de 333 pS en las transiciones de mayor tamaño. El $E_r = 14.3$ mV y tiene pobre selectividad entre cationes mono y divalentes $P_{\text{Na}}/P_{\text{Ba}} = 10$. Este canal presenta al menos 5 subestados y es claramente voltaje dependiente, mostrando más transiciones a voltajes negativos. La letra C está indicando el nivel del estado cerrado, a la derecha de cada trazo se indica el potencial con el que se obtuvo y la escala. Estos trazos se filtraron a 200 Hz con un filtro pasabajos (Warner Inst. Corp.) $n = 2$.

A)



B)

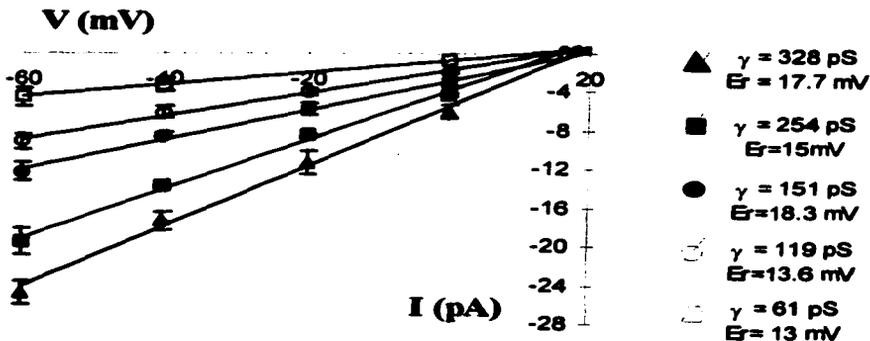


Fig 11.- A) Curva I/V de la transición de mayor conductancia del canal anterior. Presenta una $\gamma = 333 \text{ pS}$ y un $E_r = 17.7 \text{ mV}$. Podemos ver que en los voltajes estudiados la relación es óhmica. B) Curva I/V de los subestados de conductancia que presenta este canal. A la derecha de la gráfica está la conductancia y el E_r de cada uno. Los puntos de ambos gráficos son la media de 2 experimentos.

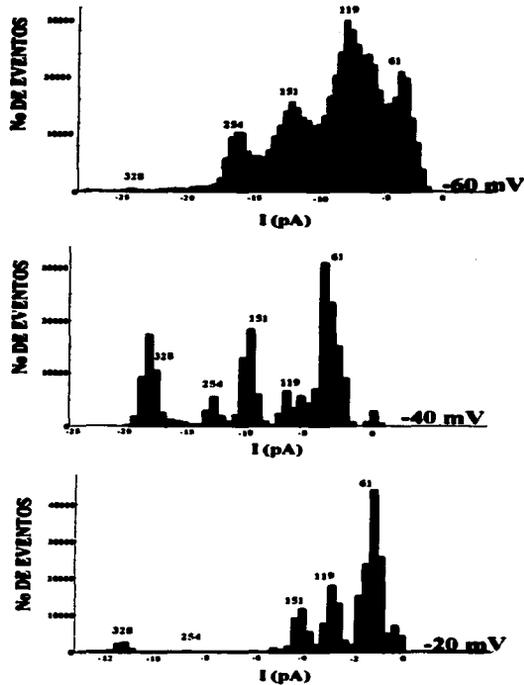


Fig 12.- Histogramas de amplitud de la corriente del canal de Ca^{2+} presentado en la fig 10. Los distintos picos indican los diferentes niveles de subconductancia. Estos histogramas se hicieron de registros de corriente de 15 a 20 seg . Los números sobre cada pico indica su conductancia en pS. A la derecha de cada gráfica está el voltaje del cual proviene.

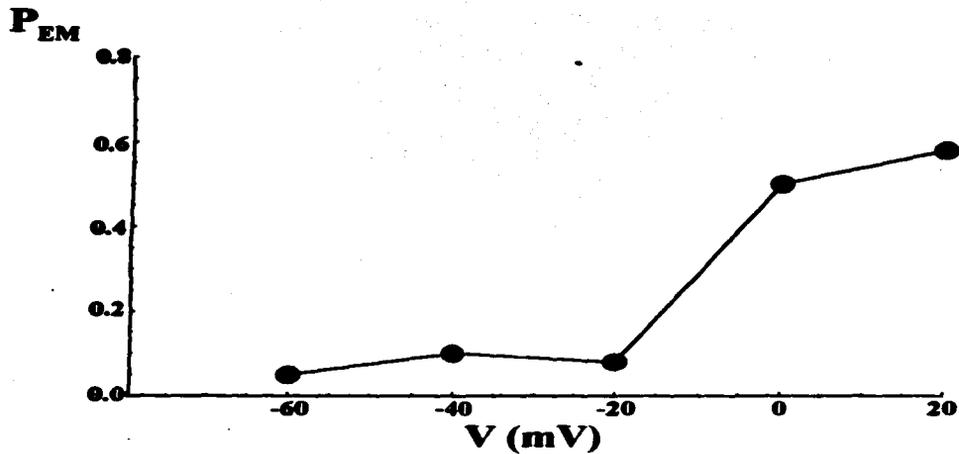


Fig 13.- Probabilidad de que el canal se encuentre en el estado de mayor conductancia (P_{EM}) en función del potencial transmembranal (Voltaje). Podemos ver que a medida que se hace más negativo el voltaje el canal permanece menos tiempo en el estado de mayor conductancia. $n = 2$.

al potencial. La probabilidad de estar abierto va disminuyendo a medida que se hace más negativo el potencial, podemos ver que varía desde 0.58 hasta 0.05 % a +20 y -60 mV respectivamente. Este canal es muy parecido al que previamente reportó nuestro grupo en el espermatozoide de erizo y ratón (69) y en membranas del espermatozoide de ratón (78).

b).- Canal catiónico de alta conductancia.- En la fig 14 se muestran trazos de este canal que presenta subestados de conductancia, permanece la mayor parte del tiempo en el estado abierto. La probabilidad de que el canal se encuentre en el estado de mayor conductancia (P_{Na}) varía desde 0.96 a + 40 mV hasta a 0.98 a -60 mV, $n = 3$. Estos datos nos dicen que el canal es muy poco dependiente de voltaje. Estos registros se obtuvieron en NaCl 104 mM, KCl 4 mM, $CaCl_2$ 2 mM en cis y en trans KMeSO₄ 100 mM. En la fig 15 se muestra la curva corriente voltaje (curva I/V) del estado de mayor conductancia (164 ± 10 pS.) de este canal, que tiene un potencial de inversión igual a 3.5 ± 2.5 mV. Esto nos dice que el canal es poco selectivo, discriminando pobremente entre cationes monovalentes $P_K/P_{Na} = 1.6$. La corriente de los trazos de este canal se filtro a 200 Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.). En la fig 16 se muestra la curva I/V de los subestados que logramos distinguir. Sus conductancias son 37, 25 y 14 pS.

b.1).- Efecto del Rojo de Rutenio (RR) sobre este canal de alta γ - El RR es un colorante inorgánico que se usó originalmente como tinción histoquímica para tefir glicosaminoglicanos (79). Es un compuesto polivalente catiónico no fluorescente que tiene la habilidad de interferir con procesos dependientes de Ca^{2+} [revisado en (77)]. Este compuesto se une en forma selectiva a túbulos T y retículo sarcoplásmico de músculo esquelético y cardiaco (80, 81 y 82). Se ha descrito que este colorante inhibe la entrada de Ca^{2+} de mitocondrias aisladas (83 y 84) y en retículo sarcoplásmico (85). Por otro lado existen evidencias de que el RR inhibe la unión de Ca^{2+} a calceuestrina, también tinte específicamente a esta y otras proteínas que se sabe que unen Ca^{2+} (86). El RR bloquea eficientemente al receptor de rianodina del retículo sarcoplásmico en músculo, en el rango μM (87).

Fórmula molecular del Rojo de Rutenio



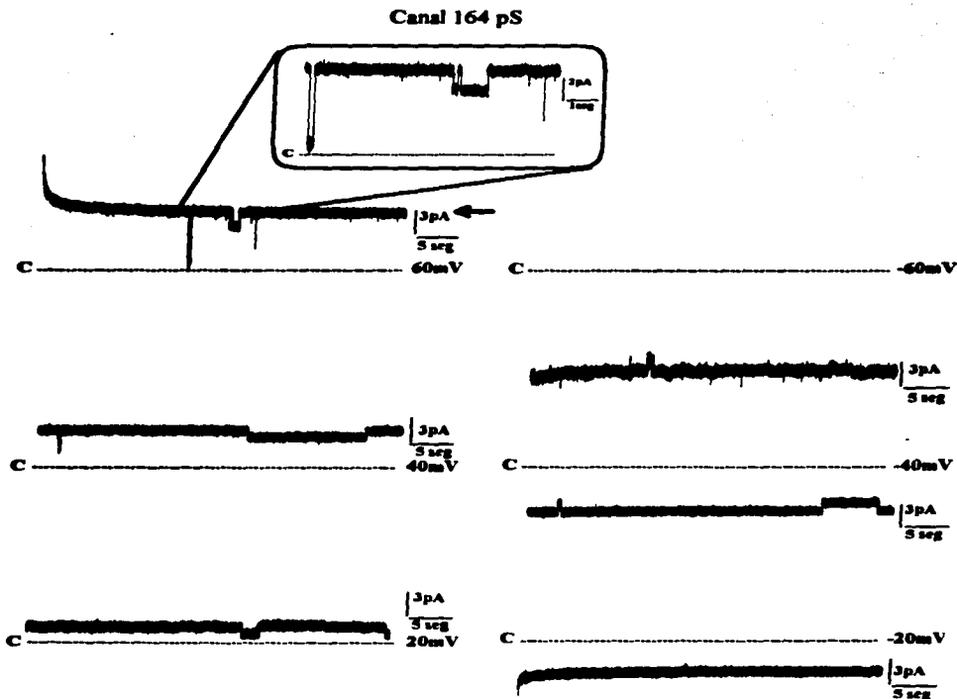


Fig 14.- Registros del canal catiónico de alta conductancia. Este experimento se realizó en NaCl, 140; KCl, 4 mM; CaCl₂, 2 mM en cis y KMeSO₄, 100mM en trans. El canal muestra una conductancia de 164 ± 10 pS. Calculada esta con el nivel de mayor conductancia indicado por la flecha. $E_r = 3.5 \pm 2.5$ mV, pobre selectividad $P_K/P_{Na} = 1.6$. La letra C está indicando el nivel del estado cerrado, a la derecha de cada trazo se indica el potencial con el que se obtuvo y la escala. El recuadro muestra una parte del registro a 60mV, pero con mayor amplificación. La corriente en los trazos mostrados se filtró a 200Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.) $n = 3$.

CURVA IV

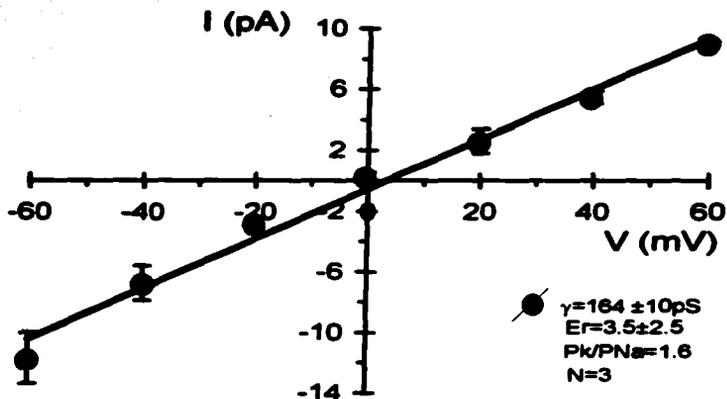


Fig 15.- Curva corriente-voltaje hecha de bicapas donde se incorporó el canal catiónico anterior . La pendiente de la curva nos da 164 pS de conductancia y un $E_r = 3.5 \pm 2.5 \text{ mV}$. Este canal discrimina muy poco entre cationes monovalentes $P_K/P_{Na} = 1.6$. Todos los puntos contienen la desviación estándar de tres experimentos.

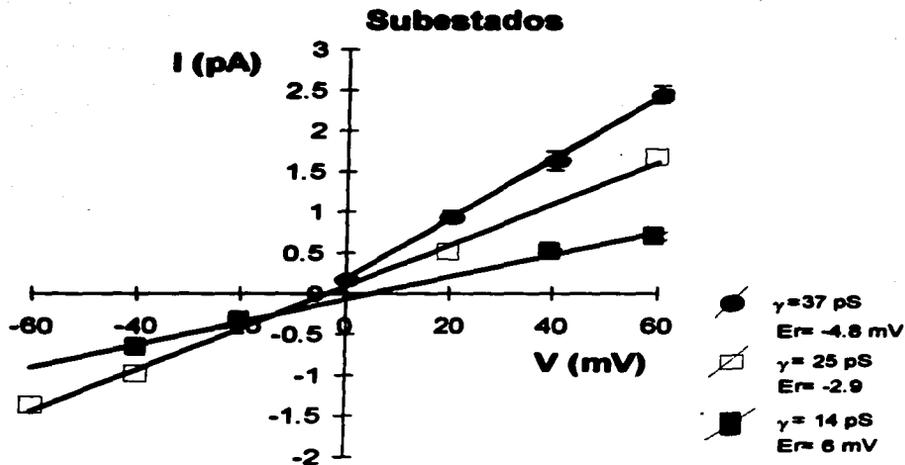


Fig 16.- Curva corriente - voltaje de 3 subestados del canal grande anterior. A la derecha se ve la conductancia y E_r de cada uno. Estos subestados tienen también baja selectividad entre cationes monovalentes. Cada punto es la media de tres experimentos. En algunos puntos la desviación estándar está cubierta por los símbolos.

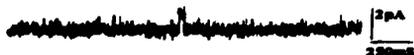
Este canal catiónico de alta conductancia (b), se parece al canal de Ca^{2+} de 333 pS. Se ha reportado anteriormente que este canal tiene algunas características comunes con el Receptor de Rianodina, como su baja selectividad entre cationes divalentes / monovalentes, alta conductancia y bloqueo asimétrico con Mg^{2+} (88). Esto nos hace pensar de manera especulativa, que el canal grande de Ca^{2+} podría pertenecer a la misma familia del Receptor de Rianodina.

Considerando lo anterior y el hecho de que el RR inhibe la RA, se probó este bloqueador sobre el canal. El RR bloqueó parcialmente la corriente original a concentraciones μM en el lado *trans* de la bicapa. En la fig 17 podemos comparar trazos del canal en condiciones control, y con 60 μM de RR en *trans*. En ellos podemos ver que la corriente principal disminuye y que hay muchos eventos de bloqueo rápido, sobre todo a -40 y -60 mV. El bloqueo es más efectivo a medida que se hace más negativo el potencial en la bicapa. En la fig 18 se muestran histogramas de amplitud de los trazos anteriores. En ellos podemos ver, como se esperaría, que en presencia de bloqueador el nivel del pico que corresponde al estado principal disminuye. Además, con el bloqueador se notan otros picos de niveles de menor conductancia. Estos datos sugieren que el bloqueo es ligeramente dependiente del voltaje. A 60 μM el bloqueo llegó hasta casi el 30 %, considerando la γ principal. Aumentando la concentración del bloqueador el efecto es aún mayor, como podemos ver en la fig 19. Vale la pena resaltar que parecería que sólo el nivel principal se bloquea. Existen evidencias anteriores del efecto del RR (μM) sobre un canal parecido a este (15 y 78).

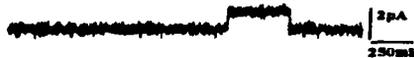
c).- Canal catiónico de 96 pS.- También se logró la inserción de un canal selectivo a cationes, ligeramente voltaje dependiente, registrado en la mismas condiciones iónicas que el anterior. En la fig 20 podemos ver trazos del canal; a voltajes positivos presenta grandes saltos de corriente; sin embargo la P_o es muy baja (< 10 %) . En la fig 21 se muestra la curva I/V de este canal donde la relación es lineal. Bajo estas condiciones la $\gamma = 96 \pm 5$ pS y el $E_r = -14.5 \pm 2.5$ mV lo que nos indica que es pobremente selectivo entre cationes monovalentes, $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 1.26$. Este canal se incorporó con muy baja P_o , siendo la mayor de 0.087 y la menor de 0.03, esto a 0 y + 40 mV respectivamente, $n = 3$. Por lo que podemos decir también que su actividad depende poco del voltaje. Nuestro grupo ha detectado un canal parecido, pero usando membranas del espermatozoide de ratón (78).

CONTROL

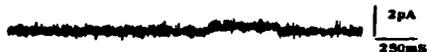
C ----- -60mV



C ----- -40mV



C ----- -20mV



R.RUTENIO 60 μ m

C ----- -60mV



C ----- -40mV



C ----- -20mV

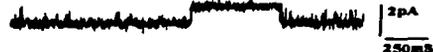
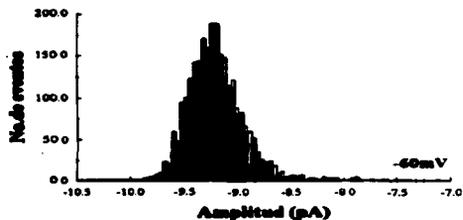


Fig 17.- Bloqueo por Rojo de Ruthenio sobre el canal catiónico de alta conductancia. Los efectos se observaron a concentraciones micromolares (60 μ M) en el lado *trans* de la bicapa. El bloqueo es electroforético y ligeramente dependiente de voltaje. La letra C indica el estado cerrado, al lado derecho de cada trazo se indica el voltaje y la escala. La corriente en los trazos mostrados se filtró a 200 Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.) n=2.

CONTROL



R.RUTENIO 60 μ M

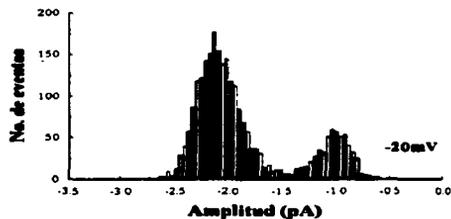
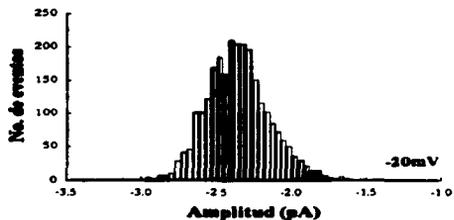
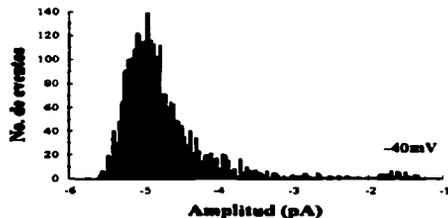
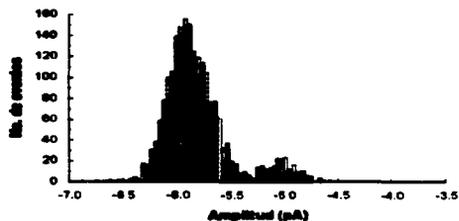
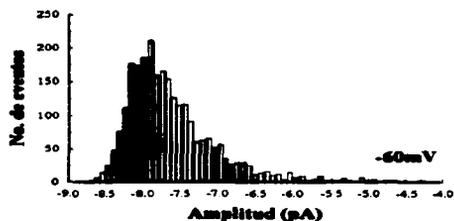


Fig 18.- Histogramas de amplitud de todos los puntos, sacados de los trazos de la página anterior. En todos se nota disminución de la corriente principal y aumento en el número y conductancia de los subestados. También disminuye el tiempo que permanece en el estado principal. A la derecha de cada histograma se indica el voltaje del trazo del que proviene.

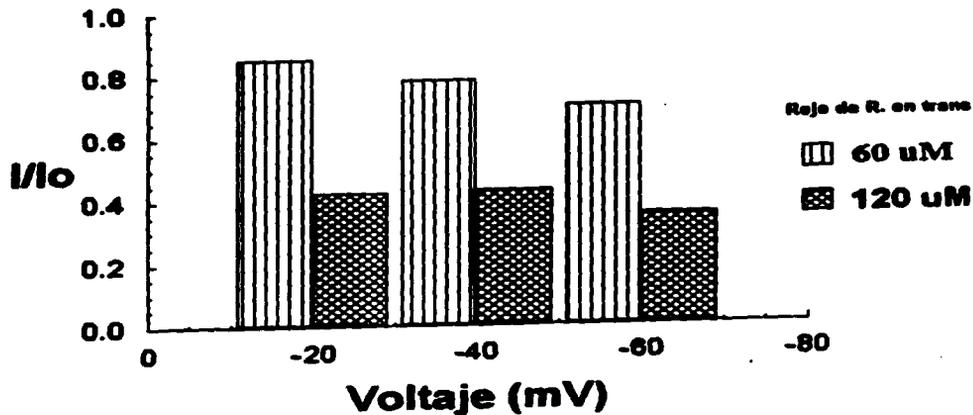


Fig 19.- Bloqueo del RR sobre el estado de mayor conductancia. El efecto es más eficiente al hacer más negativo el potencial. Esto a dos diferentes concentraciones, (I = corriente con bloqueador, I_o = corriente original). n = 2

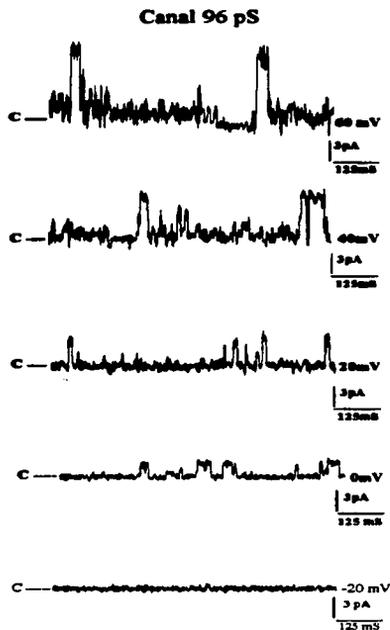


Fig 20.- Registro de un Canal catiónico, ligeramente voltaje dependiente que fue obtenido en las mismas condiciones iónicas que el anterior. La letra C está indicando el nivel del estado cerrado. A la derecha de cada trazo se indica el potencial con el que se obtuvo y la escala. El canal presenta una conductancia de 96 ± 5 pS, un potencial de reversión de -14.5 ± 2.5 mV, pobre selectividad $P_{Na}/P_K = 1.26$, y baja $P_o < 10\%$. La corriente en los trazos mostrados se filtró a 200 Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.) $n = 3$.

CURVA IV

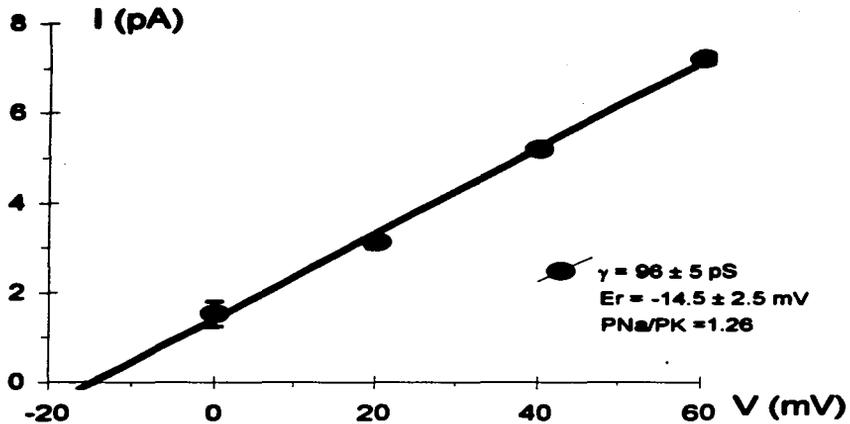


Fig 21.- Curva Corriente Voltaje de un canal catiónico de 96 pS. Como podemos ver en estos voltajes se comporta ohmicamente. Bajo estas condiciones el canal mostró un $E_r = -14.5 \pm 2.5$ mV. Lo que refleja pobre rango de selectividad entre cationes monovalentes $P_{Na}/P_K = 1.26$. Cada punto contiene la desviación estándar de tres experimentos.

d). - Canal catiónico de 33 pS. - En la fig 22 podemos ver varios trazos de esta transición que se obtuvo en las mismas condiciones iónicas que el anterior. Bajo estas condiciones el canal presenta una conductancia unitaria de 33 ± 1 pS. En la fig 23 se muestra la relación corriente voltaje, en los rangos estudiados esta relación es lineal. En esta curva podemos ver que el $E_r = -14 \pm 3.8$ mV, esto nos indica que el canal es pobremente selectivo entre cationes monovalentes $P_{Na}/P_K = 1.26$. La P_o de esta transición es muy baja variando desde 0.01 a 0.05 con -40 y $+20$ mV respectivamente, $n = 3$. Esto refleja que es muy poco dependiente de voltaje. La corriente de estos trazos se filtró a la misma frecuencia que el anterior.

e). - Canal catiónico de 21 pS. - Estas transiciones son pequeñas y selectivas a cationes. Esto lo sabemos por que al no haber Cl^- en trans, el $E_{r_{Cl}}$ es muy grande (> 300 mV), este valor está bastante alejado del E_r del canal. El $E_{r_K} = 80$ mV calculado por la ec. de Nernst (62). Los registros se obtuvieron en NaCl 104 mM, KCl 4 mM, $CaCl_2$ 2 mM en cis y en trans $KMeSO_4$ 100 mM. Bajo estas condiciones obtuvimos una $\gamma = 21$ pS y un $E_r = 6.5$ mV, indicando que es muy pobremente selectivo entre cationes monovalentes ($P_K/P_{Na} = 1.8$). En la fig. 24 podemos ver trazos de este canal filtrado a la misma frecuencia que el anterior. Tenemos registros donde estas transiciones chicas aparecen solas lo que sugiere que se trata de un canal independiente. En estos registros los saltos de corriente son de menor tamaño y menos numerosos, pero de más duración a potenciales positivos que a negativos. La P_o del canal es muy baja (ver fig 25 B), siendo de 0.04 a 60 mV, $n = 2$. Estos datos sugieren que este canal es muy poco voltaje dependiente. En la fig 25 A) podemos ver la curva I/V de este canal. Anteriormente otro grupo reportó un canal catiónico pobremente selectivo, con una conductancia parecida a esta en membranas de espermatozoide de cerdo (89).

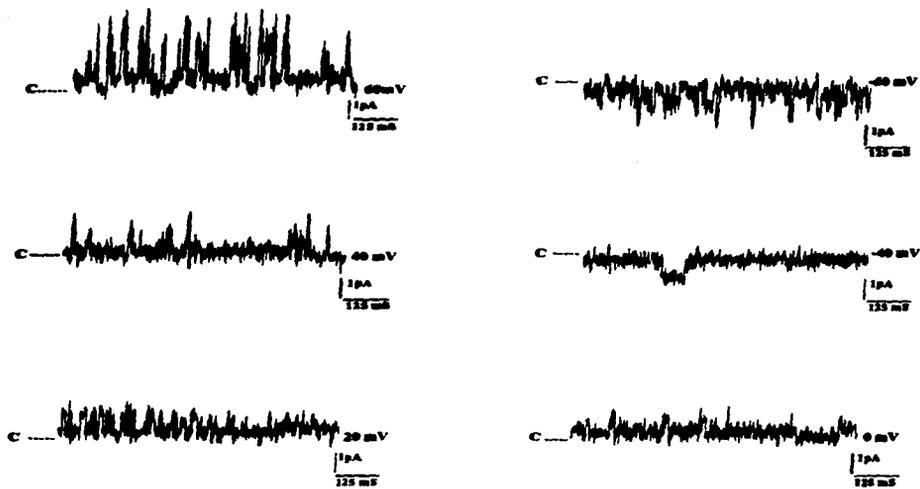


Fig 22- Registro de un Canal catiónico, que fue obtenido en las mismas condiciones iónicas que el anterior. El canal presenta una conductancia de 33 ± 1 pS, un potencial de reversión de -14 ± 3.8 mV, pobre selectividad $P_{Na}/P_K = 1.26$. La P_o es muy baja y varía poco con respecto al E_M , desde 0.01 a -40 mV hasta 0.05 a $+20$ mV. Estos datos sugieren que el canal tiene pobre dependencia al voltaje. La letra C está indicando el nivel del estado cerrado. A la derecha de cada trazo se indica el potencial con el que se obtuvo y la escala. Los registros se filtraron a 200 Hz. $n = 3$.

CURVA I / V

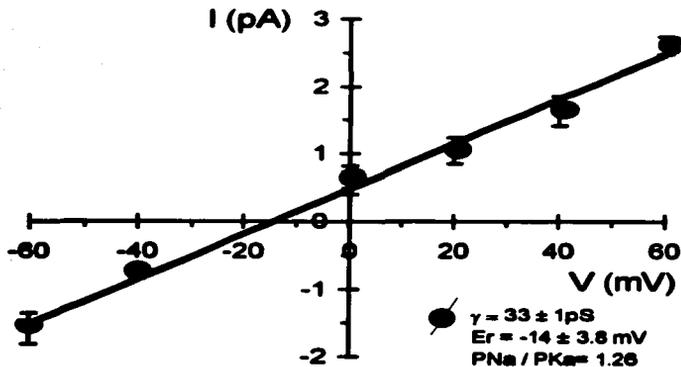


Fig 23.- Curva Corriente Voltaje de un canal catiónico cuya conductancia $\gamma = 33 \pm 1 \text{ pS}$, su $E_r = -14 \pm 3.8 \text{ mV}$. Este canal es de naturaleza ohmica y no es muy selectivo, la razón de permeabilidad entre cationes monovalentes es escasa $P_{Na} / P_K = 1.26$. Cada punto contiene la desviación estándar de tres experimentos.

CANAL DE 21 pS

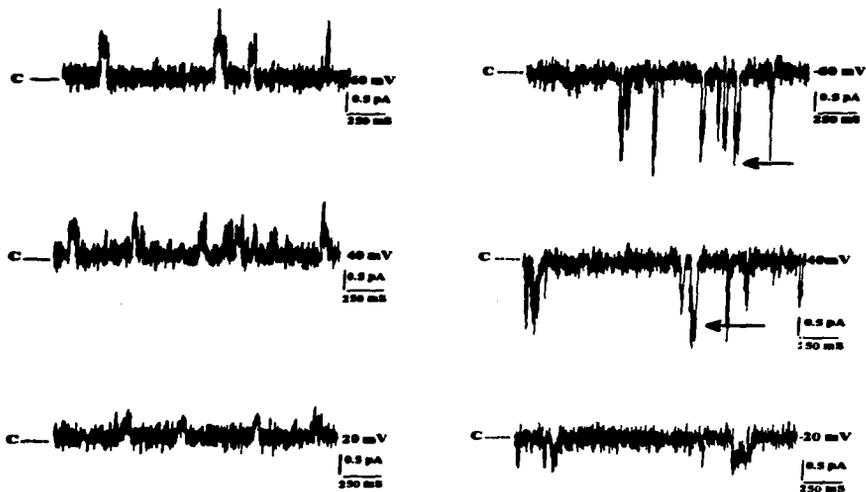
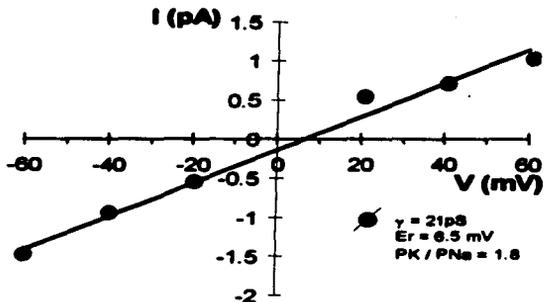


Fig 24.- Registro de un canal catiónico obtenido en NaCl 140 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2 mM *cis* y KMeSO₄ 100 mM en *trans*. Bajo estas condiciones el canal mostró un $\gamma = 21$ pS (nivel indicado con la flecha), un $E_r = 6.5 \pm 2.5$ mV y baja $P_o < 5\%$. Esto refleja pobre selectividad entre cationes monovalentes $P_K/P_{Na} = 1.8$, y sugiere poca dependencia del voltaje, ya que la P_o varía muy poco con respecto al E_M (de 0.022 a -40 mV hasta 0.04 a +60 mV). $n = 2$. La letra C a la izquierda de cada trazo indica el nivel del estado cerrado del canal, y en el lado derecho se indica el potencial con el que se obtuvo cada registro y su escala. Estos trazos se filtraron a 200 Hz con un filtro pasa bajos (Warner Inst. Corp.).

A)

CURVA IV



B)

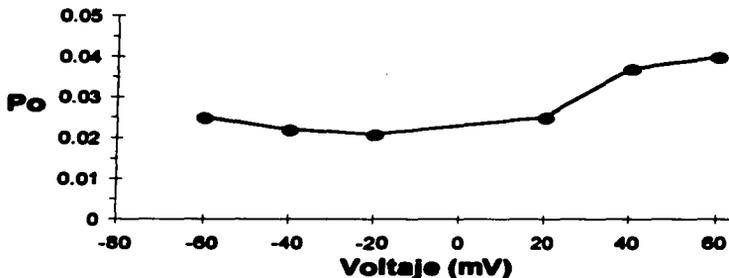


Fig 25.- A) Curva corriente voltaje de un canal de 21 pS. En estas condiciones el canal presentó un $E_r = 6.5 \text{ mV}$. También mostró ser poco selectivo entre cationes monovalentes, $P_K / P_{Na} = 1.8$. B).- Gráfica de la probabilidad de apertura (P_o) con respecto al potencial transmembranal, que corresponden a la transición de 21 pS. La actividad de este canal es muy baja, variando de 0.02 a 0.04 %. Lo anterior sugiere que es muy poco voltaje dependiente. En ambas figuras los puntos muestran la media de dos experimentos.

V.- DISCUSIÓN

La fecundación es un fenómeno biológico que depende de la interacción e intercambio de señales entre los gametos. Es evidente que los flujos iónicos son muy importantes para que la fecundación se realice exitosamente. En este sentido existen múltiples evidencias que indican que la participación de canales iónicos es clave en la fisiología del espermatozoide de mamíferos (20, 38, 97 y 91).

En el presente trabajo continuamos el estudio de la transferencia de canales iónicos directamente del espermatozoide de ratón a bicapas lipídicas planas, reportado previamente por nuestro grupo (69). Aquí logramos encontrar las condiciones óptimas para esta transferencia de canales.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia importante en cuanto a la efectividad para transferir canales de las células a la bicapa dependiendo de la RA: siendo la probabilidad del 91% en condiciones de alta RA, 71 % en los de media, 47 % en los de baja, y 17 en los de muy baja RA. Lo anterior significa que la RA es determinante para lograr una eficiente transferencia de canales. Esto refleja claramente que las condiciones del espermatozoide cambian después de experimentar la RA, haciéndose probablemente más fusogénicos. Existen evidencias que indican que la superficie del espermatozoide cambia de manera importante después de ocurrir la RA, volviéndose más fusogénicos: 1) Espermatozoides que no sufren la RA solamente se unen a la membrana del óvulo pero no se fusionan (20); 2) Los receptores a la ZP en el espermatozoide específicamente a la ZP₁, están sobre la membrana plasmática del espermatozoide no reaccionado y son difícilmente detectados en espermatozoides reaccionados. Una vez que la célula experimenta la RA, los receptores a la ZP₂, ya se pueden detectar muy claramente sobre la membrana plasmática del segmento ecuatorial y también en la membrana ecuatorial interna (20 y 51). Por otro lado es posible fusionar espermatozoides de bovino y humano a liposomas hechos de fosfolípidos artificiales, sólo después de haberles inducido la RA. Esta fusión se concentra principalmente en la zona ecuatorial (2). Lo mismo sucedió en el espermatozoide de abulón, pero este se fusiona a liposomas hechos con fosfolípidos negativamente cargados. En este último trabajo detectaron una proteína de 18 kDa localizada en el proceso acrosomal. Esta proteína aislada promueve la fusión entre liposomas, por lo que podría participar en la fusión entre los

gametos, ya sea directamente a los lípidos ó a través de otra proteína en la membrana del óvulo (102).

Merece la pena comentar que la relación entre la RA y la efectividad en la transferencia de canales a la bicapa puede deberse también, a que durante la RA se estén activando canales. Previo a este fenómeno dichos canales podrían estar inactivos y aún cuando hubiera fusión no serían detectables electrofisiológicamente. Sin embargo es posible incorporar canales activos a partir de membranas preparadas de espermatozoides no reaccionados (69, 78 y 15). Lo anterior sugeriría que, en principio, uno podría ver actividad de canales directamente de espermatozoides no reaccionados, si la región de contacto con la bicapa es parecida en composición, a las membranas aisladas. Otra explicación alternativa es que la nueva membrana expuesta por el espermatozoide después de que experimenta la RA tenga mayor densidad de canales que la membrana plasmática original. Esto último es posible, sin embargo nosotros esperaríamos que cuando hay baja RA no debería haber incorporaciones múltiples de canales, y aunque muy poco frecuentes sí se observan. Experimentos a realizarse en un futuro en nuestro laboratorio podrían ayudarnos a contestar mejor esta pregunta.

En este trabajo la RA se indujo con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 por facilidad y eficiencia. Se requiere de bastante trabajo y material para aislar zonas de óvulos en mamíferos. Por otra parte, la RA inducida con el ionóforo es generalmente más elevada que con las zonas. El A23187 intercambia dos protones por cada ion Ca^{2+} que mete, por lo que provoca aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, alcalinización del medio, y la RA. Este movimiento de iones se realiza obedeciendo el gradiente electroquímico del Ca^{2+} (74 y 75). Existen múltiples reportes donde se ha utilizado este compuesto para inducir la RA en el espermatozoide de mamífero (2 y 18). El hecho que el espermatozoide pueda interaccionar con la bicapa transfiriendo canales, no significa que el reconocimiento se vuelva inespecífico. En las condiciones que utilizamos se simplificó el fenómeno fisiológico, ya que faltan las proteínas del óvulo. Existen evidencias de fusión donde participan los lípidos de dos membranas y hay presencia de proteínas en sólo una de ellas. Esto significa que los lípidos pueden ser blanco de proteínas durante la fusión de membranas biológicas (revisado en 56 y 102).

Los eventos moleculares que suceden durante la transferencia de canales no se conocen; sin embargo a pesar de que nuestros datos no lo demuestran, podría ocurrir fusión de membranas.

Es posible que el espermatozoide interactuara con la bicapa incorporando el canal y poco después se desprenda. Esto lo decimos considerando que durante la fusión de membranas existe un fenómeno llamado "fluctuación" donde la formación del poro de fusión inicial es reversible; se sabe además que este fenómeno también se presenta en la fusión de gametos (56); puede ser que en ese momento suceda la incorporación del canal. También es posible que durante la incorporación, el espermatozoide fusione parte de su membrana junto con el canal o que el espermatozoide se fusione completamente. Esta última es poco probable ya que en una cantidad significativa de experimentos se incorporaron pocos canales. Faltan experimentos por realizar para contestar esta pregunta.

La concentración de células adecuada fue de $1-3 \times 10^6$ /ml, cuando utilizamos mayor concentración obtuvimos incorporaciones masivas que produjeron corrientes difíciles de analizar. De la misma manera cuando se usó menor concentración de células la transferencia era menos efectiva.

Se hicieron 5 experimentos probando espermatozoides con alta movilidad pero en condiciones de baja RA, y en ninguno se logró incorporación de canales. Con esto comprobamos que la movilidad de los espermatozoides no es determinante para la incorporación de canales. Hay reportes en los que espermatozoides inmóviles o débilmente móviles fueron capaces de fusionarse a óvulos libres de ZP₂ (4 y 20).

Generalmente se observó que se incorporaba a la bicapa más de un tipo de transición, posiblemente debidas a diferentes canales (83 %). Existen reportes en los que se estima que la densidad de canales iónicos en la superficie de la membrana del espermatozoide es muy baja (revisado en 106). Con base en lo anterior es posible decir que la interacción del espermatozoide con la bicapa abarca probablemente una zona de membrana de tamaño considerable.

De las incorporaciones que logramos se registraron varios tipos de canales, estos se distinguieron con base en su conductancia, selectividad y voltaje dependencia:

1.- Con estos resultados confirmamos la presencia de un canal de Ca^{2+} de alta conductancia, reportado anteriormente por nuestro grupo (69, 78). Bajo las condiciones utilizadas aquí el canal mostró una $\gamma = 333$ pS y voltaje dependencia. Este canal presentó al menos cinco subestados de conductancia, además tiene baja selectividad entre cationes mono y divalentes ($P_{Na} / P_{Ca} = 10$), cercana a la reportada anteriormente.

2.- Documentamos la presencia de otro canal catiónico que tiene también alta conductancia, 3 subestados y baja relación de permeabilidad entre cationes monovalentes $P_K/P_{Na} = 1.6$. Este canal se bloqueó a concentraciones μM de Rojo de Rutenio, disminuyendo la γ del estado principal. El bloqueo fue más eficiente cuando el potencial se hizo más negativo (electroforético), como se esperaría debido a que este colorante tiene carga positiva (es un catión polivalente). Es posible que este canal sea el de Ca^{2+} de alta conductancia y debido a que tiene un comportamiento complejo, probablemente en estos registros no vimos el estado de mayor conductancia, ni la voltaje dependencia característica, posiblemente por falta de pulsos de mayor voltaje para activar los subestados más grandes y su voltaje dependencia. También cabe la posibilidad que se trate de otro canal con características similares. En trabajos anteriores el canal de Ca^{2+} de alta conductancia, se bloqueó con RR a los mismos rangos de concentración que este último canal. Este bloqueador también inhibe la RA en el espermatozoide de erizo de mar a concentraciones μM , $\text{IC}_{50} = 75 \mu\text{M}$ (88). Falta estudiar el efecto del RR sobre espermatozoides de mamífero. En otros sistemas la afinidad del RR para bloquear sistemas de transporte de Ca^{2+} es la siguiente: 250 y 69 μM en sinaptosomas de pollo y rata, respectivamente (77). En el Receptor de Rianodina del músculo esquelético es de 1 μM . (87), y en la ATPasa de Ca^{2+} de eritrocito es 10 μM .(105).

Como se mencionó en la sección de resultados, el primer canal tiene características similares al Receptor de Rianodina de músculo esquelético (88). A pesar de que este último, se encuentra en el retículo sarcoplásmico (98), es posible que canales con estas características puedan estar en la membrana plasmática. Recientemente se reportó la presencia del RIP₁ en la cabeza del espermatozoide de ratón (22). Estudios de clonación molecular muestran que el Receptor de Rianodina es casi dos veces más grande que el RIP₁, sin embargo su estructura general es muy similar formando tetrámeros. La secuencia primaria de los dos receptores tienen regiones homólogas, particularmente en el carboxilo terminal, que es la región que se cree que forma el poro. Ambos receptores liberan Ca^{2+} de almacenes intracelulares. Por lo anterior se considera que ambos receptores pertenecen a una misma familia (107). Recientemente otro grupo detectó un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática de neuronas olfatorias, que se bloquea con RR y se estimula con IP₁, (104). Por todo lo anterior nosotros también probamos el efecto de este bloqueador sobre nuestro canal grande. Aunque para tener una evidencia más fuerte en favor de que este canal pueda pertenecer a la misma familia del Receptor de Rianodina y RIP₁, sería

conveniente probar un compuesto más específico para bloquear este tipo de canales (i.e.: Rianodina).

3.- También registramos la incorporación de un canal catiónico de 21 pS. Un canal parecido a este se reportó anteriormente en membranas del espermatozoide de cerdo, el cual se bloquea parcialmente con Nitrendipina y Verapamil; y completamente con 0.5 mM de La^{3+} (89). Aunque no se hicieron experimentos con cationes divalentes, ni la farmacología, podría ser que se trate del mismo canal.

4.- En estos experimentos se incorporó también un canal catiónico de 96 pS, pobremente selectivo entre cationes monovalentes. Este canal es muy parecido a uno previamente reportado fusionando membranas del espermatozoide de ratón a bicapas, que tenía dos formas distintas de actividad: una con baja y otra con alta P_o . Los dos modos de operar de este canal se pudieron observar en distintos experimentos, nunca juntos (78). En nuestro trabajo solo lo detectamos en la forma de baja P_o , sin embargo tuvimos una bicapa en la que presentó los dos tipos de actividad (no mostrada). Necesitamos más registros para atrevernos a proponer que es el mismo canal que tiene dos tipos de actividad y que en la reconstitución se afecta o se pierde algún componente de regulación, y por eso sólo se le puede ver de una forma en las membranas.

5.- Otro canal que pudimos registrar fue uno de 33 pS, pobremente selectivo, de baja P_o y un comportamiento parecido al de 96 pS. Es probable que estos dos últimos canales se localicen cercanos en la membrana, ya que en dos experimentos se incorporaron juntos en la misma bicapa, o bien que la transición de 33 pS sea un subestado de la de 96.

6.- Canales A-D.- En varios experimentos logramos la inserción de canales aparentemente catiónicos, que sólo estaban activos durante corto tiempo sin recuperar más su actividad. Esto podría indicar que son canales que se regulan por segundos mensajeros, que se diluyen durante la incorporación y se "lavan". Es preciso estudiar con más detalle este tipo de corrientes y probar la posible modulación con segundos mensajeros. Recientemente se reportó un canal de K^+ regulado por AMP_C en membranas del espermatozoide de erizo de mar (99). Además ya se clonó y expresó funcionalmente un canal selectivo a cationes ($P_K/P_{Na} = 1.3$), regulado por GMP_C en el espermatozoide de bovino. Su secuencia tiene un 65% de homología con el canal de fotoreceptores y con otro canal recientemente clonado de la aorta. Experimentos de "patch clamp" indican que puede estar presente en la membrana del espermatozoide de mamífero (100).

Por otra parte el RIP, se localizó en la región acrosomal de la membrana del espermatozoide de rata, ratón, hámster y perro (22), y se tiene evidencia de que durante la RA hay síntesis de IP, en el espermatozoide (103 y 40).

Casi todos los canales que logramos transferir fueron de selectividad catiónica y pobremente selectivos entre cationes monovalentes. Esto concuerda con los datos reportados por Florman (95 y 91), donde encontraron flujos iónicos que tienen características de canales catiónicos pobremente selectivos en espermatozoides de bovino y ratón. Nuestros resultados también son consistentes con la presencia de canales de K^+ y de Ca^{2+} dependientes de voltaje cuya actividad puede disparar la RA (67). Aunque se ha reportado presencia de canales aniónicos en la membrana del espermatozoide de ratón (78), cerdo y carnero (23 y 47), nuestros datos sugieren que la densidad de canales catiónicos en la membrana plasmática del espermatozoide de ratón es mayor.

Es evidente que ZP desencadena en el espermatozoide cambios en la permeabilidad de su membrana que lo llevan a experimentar la RA. Se ha postulado que el paso inicial de esa cascada de eventos es una depolarización de la membrana del espermatozoide que después activa otro u otros canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, produciendo una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ y pH_i suficiente para producir este fenómeno excitotóxico (95). Hay evidencias que apoyan que los canales que participan en la segunda respuesta a la ZP son de Ca^{2+} tipo T (93). Sin embargo estos canales solos no pueden explicar el aumento sostenido de Ca^{2+}_i , esto por su rápida inactivación. Para lograr la depolarización necesaria en el primer paso de la RA, es de esperarse que se abran canales catiónicos poco selectivos como los que se detectaron en el espermatozoide de bovino y ratón (91 y 95). Alguno de los canales que detectamos podría ser responsable de esta depolarización inicial. El canal que creo reúne algunas de las características esperadas para este papel podría ser el de 96 pS. Por que siendo ligeramente más permeable para el Na^+ , si este canal se abre dejaría entrar dicho ion a la célula con lo que se produciría la depolarización inicial. Para saber si esto último es cierto necesitamos hacer farmacología del canal de 96 pS. Los otros canales que también registramos podrían participar posteriormente durante la penetración de la ZP y/o fusión con la membrana plasmática del óvulo.

Las condiciones experimentales que aquí utilizamos son un modelo simplificado que sirve para facilitar el estudio de la interacción entre gametos. Esto porque al poner en contacto al

espermatozoide directamente con la bicapa estamos quitando las proteínas del óvulo. El uso de esta técnica podría permitir identificar los componentes que determinan la fusión entre gametos.

En el presente trabajo registramos canales aniónicos en muy pocas ocasiones. Esto posiblemente se deba a que exista mayor densidad de canales catiónicos que aniónicos en la membrana, o bien a que los canales aniónicos necesiten otras condiciones para promover su incorporación. Estos datos concuerdan con reportes anteriores, donde registran más canales catiónicos que aniónicos en la membrana del espermatozoide (78 y 89).

VII.- CONCLUSIONES

- 1.- Es posible transferir canales iónicos del espermatozoide completo de ratón directamente a bicapas lipídicas planas. Reportado previamente (69).
- 2.- La RA en el espermatozoide es determinante para la eficiente incorporación de canales.
- 3.- La concentración ideal de espermatozoides es de $1-3 \times 10^6$ células / ml.
- 4.- La movilidad de las células no afecta significativamente la efectividad en la transferencia de canales.
- 5.- Se documentaron registros de cuatro tipos de canales catiónicos, con pobre selectividad entre cationes monovalentes, que presentaron las siguientes características particulares:
 - a) Conduce Ca^{2+} , $\gamma = 333$ pS, voltaje dependiente, tiene pobre selectividad entre cationes mono y divalentes ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 10$) y presenta al menos 5 subestados de conductancia.
 - b) $\gamma = 164$ pS, poco voltaje dependiente, presenta al menos tres subestados de conductancia, $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} = 1.6$ y se bloquea parcialmente con $60 \mu\text{M}$ de RR aplicado en el lado *trans* de la bicapa.
 - c) $\gamma = 96$ pS, ligeramente voltaje dependiente, baja $P_0 (< 10 \%)$, $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 1.2$ y un posible subestado de 33 pS.
 - e) $\gamma = 21$ pS, $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} = 1.8$, baja $P_0 (< 5 \%)$ y es muy poco voltaje dependiente.
- 6.- Es probable que en la membrana del espermatozoide haya mayor densidad y quizás más tipos de canales catiónicos que aniónicos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- J. E., Fléchon: Acrosome reaction, sperm penetration and gamete fusion in mammals. en *New Horizons in sperm cell research*; editado por Mohri, H. p 235-246 Japan Sci. Soc.Press,Tokyo/Gordon and Breach. Sci. Publ. New York (1987).
- 2.- Eugene G.J.M. Arts, Jaap Kuiken, Siemen Jager and Dick Hoekstra: Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the ecuatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217: p 1001-1009 (1993).
- 3.- D.F. Katz, E.Z. Drobnis, G.N. Cher , J Baltz, A.I. Yudin, R.A. Cone y L.Y. Cheng. The biophysics of sperm penetration of the cumulus and zona pellucida. En *New Horizons in sperm cell research*; editado por Mohri, H. p. 275-285 Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Gordon and Breach. Sci. Publ. New York (1987).
- 4.- Diana G. Myles: Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Developmental Biology* 158: p 35-45 (1993).
- 5.- Ward, G.R. and Kopf, G.: Molecular events mediating sperm activation. *Devel. Biol.* 158: p 9-34 (1993).
- 6.- Bleil, J.D. : Sperm receptors of mammalian eggs. En *Elements of mammalian fertilization*. Editado por P.M. Wassarman, CRC Press, Boca Ratón Vol. 1, p 132-152 (1991).
- 9.- Bookbinder, L.H., Cheng, A. y Bleil, J.D.: Tissue and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Sciens* 269: p 86-99 (1995).
- 10.- Yanagimachi, R. Zona free hamster eggs:their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10: p 187 232 (1984).
- 11.- Jeffrey D. Bleil. : Sperm receptors of mammalian eggs. En *Elements of mammalian fertilization*. Editado por P.M. Wassarman, CRC Press, Boca Ratón Vol. 1, p 132-152 (1991).
- 12.- Ben Spungin, Ilana Margalit and Heim Breitbart: A 70 kDa protein is transferred from the outer acrosomal to the plasma membrane during capacitation. *FEBS Letters* 357: p 98-102 (1995).
- 13.- E.M. Eddy., The spermatozoon. En *The Physiology of Reproduction*. Editado por Knobil y J.Neil. Raven Press Ltd., New York (1988).
- 14.- Diana G. Myles, et al.: Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 91 p 4195-4198 (1994).
- 15.- Thomas Cox, P.Campbell, and R.N.Peterson: Ion channels in boar sperm plasma membranes: characterization of a cation selective channel. *Mol. Reprod. Dev.* 30: p.135-147 (1991).
- 16.- Paul M. Wassarman: Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 108: p 1-17 (1990).
- 17.- Miguel N. LLanos: Evidence in support of a role for Ca²⁺- activated K⁺ channels in the hamster sperm acrosome reaction. *The journal of experimental zoology* 269: p 484-488 (1994).
- 18.- Patrick Fénichel, M.D., et al: Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. Vol.55 No.5 p 994-999 (may. 1991).
- 19.- Alberto Darazon y Meredith Gould-Somero: Fecundación . *Ciencia y desarrollo*, 33: p 17-27 (1982).

- 20.- R. Yanagimachi: Mammalian fertilization. En *Physiology of reproduction*, vol. I, editado por Ernst Knobil y J.D. Neill. Raven Press (1988).
- 21.- Michel Glasser: Inmunocytochemical and Biochemical Characterization of Guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Developmental Biology*, 146 : p 438-450 (1991).
- 22.- Loren D. Walensky y Solomon H. Snyder : Inositol 1,4,5 triphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology*, vol. 130 No.4 p 857-869 (Agust 1995).
- 23.- Eduardo R.S. Roldán : Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*, vol.266 : p 1578-1581.
- 24.- C. Christopher Miller., et al : Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Developmental Biology*, 137: p 276-286 (1990).
- 25.- Eugene G.J.M. Arts, Jaap Kuiken, Siemen Jager and Dick Hoekstra: Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the ecuatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217: p 1001-1009 (1993).
- 26.- Pierre Vanderhaeghen: Olfactory receptors are display on dog mature sperm cells. *The Journal of Cell Biology*, vol.123 No.6 part 1 p 1441-52 (decem. 1993).
- 27.- Rochwerger, L., y Cuasnicú, P.S: Redistribution of a rat sperm epididimal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol. Reprod. Dev.*, 31 : p 34-41 (1992).
- 28.- C.J. de Jonge, et al: Regulation of the human sperm acrosome reaction by two second messenger pathways. En *Comparative spermatology 20 years after*, editado por B Bacceti., Serono Simposia, Raven Press, vol:75 p 143-147 (1991).
- 29.- Amann, R.P., Hay, S.R. and Hammerstedt, R.H: Yield characteristics, motility and AMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol Reprod.*, 27: p 723-733 (1982).
- 30.- M. Lorraine Leibfried and Barry D.Bavister: The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *Gamete research*, 4: p 57-63 (1981).
- 31.- Meizel S., et al: Taurine and hipotaurine: their effects on motility, capacitation and acrosome rection of hámster sperm in vitro and their presence in eperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev. Growth and Diff.*, vol. 34: p 483-494 (1980).
- 32.- Don S.Lin, William E. Connor, Don P. Wolf, Martha Neuringer, y David L. Hachey: Unique lipids of primate spermatozoa: deamosterol and docosahexaenoic acid. *Journal of lipid research*, vol.34: p 491-499 (1993).
- 33.- B.K. Davis : Timing of fertilization in mammals sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Pronc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: p 7560-64 (1981).
- 34.- David E. Wolf, Adrienne C.Lipcomb, and Valerie M. Maynard: Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry*, 27: p 860-865 (1987).
- 35.- Gregory S. Kopf and George L. Gerton: The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. En *Elements of mammalian fertilization*, editado por Paul M. Wassarman. CRC Press vol. I : p 154-190 (1991).
- 36.- Jenkins, A.D., et al : Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rat testis, and epididimis. *Biol. Reprod.*, 23: p 981-987 (1980).
- 37.- Epel, D. and Vacquier: Membrane fusions evets during invertebrate fertilization. *Cell Surface Rev.*, 5: p 1-633 (1978).

- 38.- Ward, G.R., and Kopf, G: Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.*, 158: p-34 (1993).
- 39.- Hiroko Takano, R. Yanagimachi and Umberto A. Urch: Evidence of acrosine activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote*, 1: p 79-91 (1993).
- 40.- Alberto Darzón, Arturo Liévano y C. Beltrán: Ion channels: Key elements in gamete signaling. En *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol 34: p117-67. Editado por Roger A. Pederson y Gerald P. Schotten, Academic Press (1996).
- 41.- García Soto, J., De la Torre, L. y Darzón A: Increasing intracellular pH of sea urchin sperm with NH_4Cl induces Ca^{2+} uptake and acrosome reaction in the absence of egg jelly. *FEBS Letters*, 190: p 33-36 (1985).
- 42.- González-Martínez, M. y Darzón, A: A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Letters*, 218: p 247-250 (1987).
- 43.- Darzón, A., García-Soto, J., González, M., Guerrero, A., Sánchez, J.A. and Liévano, A: Ion transport mechanism in sea urchin sperm. En *New horizons in sperm cell research*. Editado por Mori H. Japan Scientific Societies Press, and Gordon and Breach Science Publishers, p 169-83 Tokyo (1987).
- 44.- C.J. De Jonge., S.R. Mack., E. Radwanska y L.J.D. Zaneveld: Regulation of the human sperm acrosome reaction by two second messengers pathways. En *Comparative spermatology 20 years after*, editado por B. Baccetti. Serocon Symposia, Raven Press, vol. 75: p 143-147 (1991).
- 45.- Domínguez, S.E., Garbers, D.L: The fucose sulfate glycoconjugate that induces the acrosome reaction in spermatozoa stimulates inositol 1,4,5 triphosphate accumulation. *J.Biol. Chem.*, 263: p 690-695 (1988).
- 46.- Carmen Beltrán, Otilia Zapata y Alberto Darzón: Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylate cyclase. *Biochemistry*, 35: 7591-98 (1996).
- 47.- A., Liévano y A., Darzón: Ion channels in sperm. En *cell physiology Source Book*, editado por Nicholas Sperelakis, 2 da. edición. Academic Press Inc., p 330-39 (1995).
- 48.- Gulyas, B.J: Cortical granules of mammalian eggs. *Int. rev. Cytol.*, 63: p 357-392 (1980).
- 50.- Duncan, A.E. and Fraser, L.R: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an Mr 95000 phosphotyrosine-containing protein. *J. Reprod. Fert.*, 97: p 287-99 (1993).
- 51.- Bleil, J.D. y Wasserman, P.M: Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J.Cell Biol.*, 102: 1363-71 (1986).
- 52.- L.H. Bookbinder, A.Cheng, J.D. Bleil: Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* Vol.269: p 86-89 (july 1995).
- 53.- L. Strayer : *Bioquímica*. Tercera edición., p: 996 Editorial Reverté (1988).
- 54.- Susan Budavari, editor: *The index Merck.*, p: 249, onceava edición (1989).
- 55.- Kenneth O. Turner and Stanley Meizel: Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, Vol. 213 No. 3 : p 774-780 (1995).
- 56.- Joshua Zimmerberg, Steven S. Vogel, and Leonid V. Chernomordick: Mechanisms of membrane fusion. En *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, editado por Donald M. Engelman vol. 22 : p 433-66 (1993).

- 57.- Mark K. Bennett and Richard H. Scheller: Molecular correlates of synaptic vesicle docking and fusion. *Curr. Op. in Neurobi.*, 4: 324-29 (1994).
- 58.- Smith, S.J. y Augustine, G.J. : Calcium ions , active zones and synaptic transmitter release . *Trends Neurosci.* 11 : p 458-64 , 1988 .
- 59.- Arturo Liévano M. y Alberto Darzon I. : Canales iónicos una breve introducción . *Mensaje Bioquímico*, vol. XVIII : p 163-88 (1994)., editores S.Morales L., F. Martínez M. y A. Saavedra.
- 60.- Felipe Espinosa y Alberto Darzon: Mouse sperm potential: changes induced by Ca^{2+} ., *FEBS Letters*, 372: p 119-125 (1995).
- 61.- Christopher Miller: How ion Channel Proteins work. En *Neuromodulation* p. 39-63 (1986).
- 62.- Bertil Hille: Introduction. En *Ion Channels of Excitable membranes*. Segunda edición p 1-20 (1992).
- 63.- F. Anne Stephenson: Ion channels., *Curr. Opin. in Struct. Biol.*, vol 1: p. 569-74 (1991).
- 64.- Rivka Sherman-Gold., editor: Bioelectricity . en *Axon guide*, p. 1-16 , editado por Axon instruments, Inc. (1993).
- 65.- Nicholas Sperelakis: Origin of resting potential. En *Cell Physiology source book.*, editado por Nicholas Sperelakis : p. 67-90 (1995). Academic Press.
- 66.- Wassarman. P. M. : Cellular and molecular elements of mammalian fertilization. En "Mechanisms of fertilization" (B. Dale Ed.), p. 305-314. Springer -Verlag, New York/Berlin (1990).
- 67.-Florman. H., Corron. M. E., Kim . T.D-H., and Babcock. D. F. : Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal axocytosis. *Dev. Biol.* 152, 304-14 (1992).
- 68.- Tiwari-Woodruff, S., Peterson , R. N., and Cox, T.: Calcium channels from boar sperm plasma membranes with L type characteristics : Sensitivity to Bay-K enantiomers. *Biophys J.* 66, A423 (1994).
- 69.- Beltrán C., Darzon A., Labarca P., and Liévano A.: A high-conductance multistate Ca^{2+} channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Lett.* 338: p. 23-26 (1994).
- 70.- Pedro Labarca y Ramón Latorre: Insertion of ion channels into planar lipid bilayers by vesicle fusion. En *Methods in enzymology*, Vol 207 : p. 447- 63 (1992).
- 71.- Folleto Percoll Methodology and applications, Density Marker Beads for calibration of gradients of Percoll. p. 2-3 . Editado por Pharmacia .
- 72.- W. Hanke and W. R. Schlue: Technical details of bilayer experiments. En *Planar lipid bilayers, methods and applications*. Biological Techniques series. p. 10-43. Editado por David B. Sattelle. Academic Press (1993).
- 73.- L. Cauler, W. Mayhew and T. J. Teyler: Discrete sampling of continuous biological signals . Analog-to-Digital conversion. *Brain Research Bulletin*, Vol. 11 p. 755-760, (1983).
- 74.- L. Stryer.: Los Ionóforos de Ca^{2+} , amortiguadores e indicadores son herramientas experimentales muy valiosas. En *Bioquímica*, tercera edición. p. 996. Editorial Reverté, (1988).
- 75.-Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson:

- Ionophores can be used as tools to increase the permeability of membranes to specific ions. En *Molecular Biology of the cell.*, Tercera edición. p.511. Garland Publishing, Inc. (1994).
- 76- Paul M. Wassarman and Eveline S. Litscher: Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. in Develop. Bio.* Vol. 30 : p 1-19 (1995).
- 77.- Murray G. Hamilton y Paul M. Lundy: Effect of Ruthenium Red on Voltage-Sensitive Ca^{2+} Channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*
- 78.-Pedro Labarca, Otilia Zapata, Carmen Beltrán y Alberto Darszon: Ion channels from the mouse sperm plasma membrane in planar lipid bilayers. *Zygote* Vol.3 (August), pp 199-206 (1995).
- 79.- Gustafon G., Phil, T. : Staining of mast cells acid glycosaminoglycans by ruthenium red . *Nature.* (London) 216: pp. 697-99 (1967).
- 80.- Luft, J.(1971) *Anat. Res.* 171: 369-416.
- 81.-Howell, J.: Intracellular binding of ruthenium red in frog skeletal muscle. *J. Cell Biol.*62:pp.242-47.
- 82.-Forbers,T.(1979) *CELL Tissue Res.* 200: pp.367-82.
- 83.- Moore, C. : Specific inhibition of mitochondria calcium transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42: pp. 298-305 (1971).
- 84.- Ash, G.: Ruthenium Red as a probe in assessing the potential of mitochondrial to control intracellular calcium in liver *FEBS lett.* 78: pp. 166-68 (1977).
- 85.- Smith, J,Imagawa, J., Fill, K., Campel,Coronado, R.: Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J.Gen.Physiol.* 92: pp.1-26 (1988).
- 86.- Charuck, J., Pirraglia,C., Rethmeir, R.: Interaction of ruthenium red with calcium binding proteins. *Anal. Biochem.* 188: pp.123-31 (1990).
- 87.- Smith, J.,Coronado, R., Meissner, G.: Single channel calcium and barium currents of large and small conductance from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* pp. 642-647 (1986).
- 88.-Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E.C. y Darszon, A: Ca^{2+} channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95:pp. 273-96 (1990).
- 89.- Tom Cox y R.N. Peterson: Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. *Bioch.Bioph.Res.Com.* 161:pp.162-68 (1989).

- 90.- Fraser, L. R., Umar, G. y Sayed, S.: Na⁺-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 97: pp.539-49 (1993).
- 91.-Christophe Arnoult, Yang Zeng, y Harvey M. Florman.: ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cel. Biol.*134:pp. 637-45. (August 1996).
- 92.- Yang Zeng, Edward N. Clark, and Harvey M. Florman.: Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates Zona Pellucida -dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171:p.p. 554-63 (1995).
- 93.- Arturo Liévano, Celia M. Santi, Carmen. J. Serrano, Claudia L.Treviño, Anthony R. Bellvé, Arturo Hernández-Cruz, Alberto Darzon.: T-type Ca²⁺ channels and α_{1B} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Letters* 338:p.p. 150-54 (1996).
- 94.-Christophe Arnoult, Richard A. Cardullo, José R Lemos, and Harvey M. Florman.: Activation of mouse sperm T-Type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:p.p. 13004-09 (November 1996).
- 95.- Harvey M. Florman.: Secuencial, focal and global elevations of sperm intracelular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Devel. Biol.* 165:p.p.152-64 (1994).
- 96.- Guerrero, A y Darzon, A.: Evidence for the activation of two different Ca²⁺ channels during the egg jelly induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 264: p.p. 19593-99 (1989).
- 97.- Coronado , A., Labarca, P, Beltrán, C., García Soto, J. y Liévano, A.: Sea urchin sperm: an ion channel reconstitution study case. *Methods (a companion to methods enzymol.) G:* p.p. 37-50 (1994).
- 98.- Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M. and Vaughan, D.M.: Structure and function of Ryanodine receptors. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 266: C 1485-504 (1994).
- 99.- Pedro Labarca, Celia Santi, Otilia Zapata, Ezequiel Morales, Carmen Beltrán, Arturo Liévano y Alberto Darzon.: A cAMP regulated K⁺-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev. Biol.* 174: p.p. 271-80 (1986).

- 100.- Ingo Weyand, Matthias Godde, Stephan Frings, Jocelyn Weiner, Frank Muller, Wolfran Altenhofen, Hans Hatt y U. Benjamin Kaupp.: Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368: p.p.859-63 (1994)
- 101.- Alberto Darszon y Arturo Liévano: Reconstitución de canales iónicos. En *Biofísica y Fisiología Celular*. Editado por Ramón Latorre, José López-Barneo, Francisco Bezanilla y Rodolfo Llinás. Universidad de Sevilla. p.p. 387-401 (1996).
- 102.- Willie J. Swanson y Victor D. Vacquier.. Liposome fusion induced by a M_r 18000 protein localized to the acrosomal region of acrosome-reacted abalone spermatozoa. *Bioch.* 34: p.p. 14202-208 (1995).
- 103.- Domino, S., Garbers, D.: The fucose sulphate glycoconjugate that induces the acrosome reaction in sperm stimulates inositol 1, 4, 5 triphosphate accumulation. *J. Biol. Chem.* 263: 690-95 (1988).
- 104.- Restrepo D, Miyamoto T, Bryant BP, Teeter JH : Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science* 249: p.p.1166-68 (1990).
- 105.- Eileen L. Watson, Frank F. Vincenzi y Paul W. Davis: Ca²⁺ -activated membrane ATPase: Selective inhibition by ruthenium red. *Biochim. Biophys. Acta*, 249: pp 606-610 (1971)
- 106.- Guerrero, A., Sánchez, J. A., y Darszon, A. (1987). Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique. *FEBS Lett.* 220, pp 295- 298 (1987).
- 107 .- Takayuki Michikagua, Atsushi Miyawaki, Teiichi Furuichi, y Katsuhiko Mikoshiba.: Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors and Calcium signaling. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10 (1): pp 39-55 (1996).