

61  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

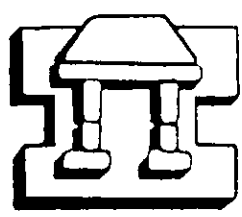
Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
CAMPUS IZTACALA

DETECCION Y CARACTERIZACION DE UN  
SISTEMA DE INFLUJO DE CALCIO  
DEPENDIENTE DEL VOLTAJE EN EL  
ESPERMATOZOIDE HUMANO.

T E S I S  
Que para obtener el título de:  
BIOLOGO

p r e s e n t a

ROSA LAURA LINARES HERNANDEZ



Asesor: Dr. Marco González Martínez

IZTACALA Los Reyes Iztacala, Estado de México 1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

268068



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.

DETECCION Y CARACTERIZACION DE UN SISTEMA DE INFLUJO DE CALCIO  
DEPENDIENTE DEL VOLTAJE EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO.

POR ROSA LAURA LINARES HERNANDEZ.

TESIS REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE FARMATOLOGIA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO (EN LA CIUDAD UNIVERSITARIA) BAJO LA DIRECCION DEL DR.  
MARCO GONZALEZ MARTINEZ.

Esta tesis la dedico a quienes de alguna forma contribuyeron con ella.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| Abreviaturas.....  | 1  |
| Resumen .....  | 2  |
| I. Introducción .....                                      | 3  |
| El espermatozoide.....                                     | 3  |
| El óvulo.....  | 5  |
| Interacción óvulo-espermatozoide.....                      | 5  |
| La reacción acrosomal.....                                 | 7  |
| II. Objetivos.....   | 10 |
| III. Metodología .....                                     | 10 |
| Reactivos.....   | 10 |
| Procedimientos experimentales.....                         | 10 |
| 1. Aislamiento de espermatozoides .....                    | 10 |
| 2. Mediciones fluorométricas.....                          | 12 |
| 3. Inducción y determinación de la reacción acrosomal..... | 17 |
| 4. Análisis estadístico.....                               | 19 |
| IV. Resultados.....  | 20 |
| Dependencia del voltaje.....                               | 20 |
| Caracterización farmacológica.....                         | 29 |
| Inactivación.....  | 33 |
| Efecto del pH.....   | 36 |
| Efecto del voltaje en la reacción acrosomal.....           | 40 |
| V. Discusión.....  | 44 |
| VI. Conclusiones .....                                     | 50 |
| VII. Bibliografía .....                                    | 51 |

## ABREVIATURAS

- [  $\text{Ca}^{2+}$  ]<sub>i</sub>.- Concentración de calcio intracelular
- [  $\text{K}^{+}$  ]<sub>i</sub>.- Concentración de potasio intracelular
- BCECF-AM.- 2',7'-bis(2-carboxietil-5-carboxifluoresceína,acetoximetil ester
- CCCP.- carbonil cianido m-clorofenil hidrazona
- DiSC3(5).- Yoduro de 3,3'-dipropiltiodicarbocianina
- DMSO.- Dimetil sulfóxido
- Ek.- Potencial electroquímico para la distribución del potasio
- Em.- Emisión
- Ex.- Excitación
- F.- Fluorescencia
- Fb.- Fluorescencia unida
- Ff.- Fluorescencia libre
- Fura-2-AM.- acetoximetildiaminoester
- H-HSMm.- HEPES-Human Sperm Medium sin lactato ni piruvato de sodio
- HSM.- Human Sperm Medium
- Kd.- Constante de disociación
- Nife.- Nifedipina
- OMS.- Organización Mundial de la Salud
- pH<sub>i</sub>.- pH intracelular
- PTI.- Photon Technology International
- R.- Radiometría
- RA.- Reacción acrosomal
- Rmax.- Radiometría máxima
- Rmin.- Radiometría mínima
- TxP.- Toxina Pertusis
- U:A.- Unidades arbitrarias
- Vm.- potencial de membrana
- ZP.- Zona pelúcida

## RESUMEN

Un evento sobresaliente en la fecundación es la reacción acrosomal en el espermatozoide (RA). La RA tiene como función primordial la liberación de las enzimas líticas que actúan sobre las cubiertas del óvulo y también exponer una nueva membrana especializada que permite la fusión del espermatozoide con el óvulo. La RA es un evento dependiente de calcio, estimulado naturalmente por la progesterona y la zona pelúcida (ZP) en mamíferos. Debido a que los inductores de la RA promueven influxos de calcio asociados con la despolarización de la membrana y el aumento del pH, se estudió la dependencia de voltaje, la farmacología y el efecto del pH en el transporte de calcio, en el espermatozoide humano no capacitado, con el uso de técnicas fluorescentes. Para ello se adaptó un equipo de fluorimetría (PTI) que nos permitió medir las emisiones de los colorantes sensibles a potencial de membrana ( $V_m$ ) simultáneamente a los sensibles al calcio o al pH intracelular ( $pH_i$ ). Con esto se demostró que en los espermatozoides humanos hay un sistema de transporte sensible al voltaje con las siguientes características: 1) activación en un rango de voltaje de  $-60$  a  $-15$ , tras adiciones de potasio, desde un  $V_m$  al reposo de  $-70$  mV, no inactivable durante 1 minuto; 2) inhibición a  $V_m$  de reposo despolarizados ( $-53.8$  y  $-35.3$  mV) bajo pulsos de voltaje a  $-17$  mV; 3) bloqueo por níquel pero no por nifedipina; y 4) estimulación por una alcalinización dependiente de  $V_m$ . Los registros simultáneos sugieren que estos canales no concuerdan con ningún tipo de canal anteriormente descrito. La RA, que puede inducirse con despolarización con 60 mM de KCl, se estimuló ligeramente cuando la despolarización fue precedida de una hiperpolarización, esto indica que este sistema al estimular la RA, pudiera participar en los mecanismos disparados por la progesterona y la ZP.

# **I. INTRODUCCIÓN**

Todo organismo vivo cumple con un ciclo que le permite perpetuar su especie. Este ciclo encuentra continuidad a través del fenómeno conocido como reproducción. Sus mecanismos son tan variados que podemos encontrar desde una simple división mitótica (reproducción asexual), hasta los procesos más complejos que conducen a la mezcla de genomas de dos individuos distintos (reproducción sexual).

Para los organismos con reproducción sexual la interacción entre un óvulo y un espermatozoide marca el inicio de una serie de eventos que definen la fecundación. El éxito de estas interacciones permite a estas células fusionar sus núcleos para dar origen a un nuevo ser genéticamente diferente a los demás de su especie proporcionando las bases de la herencia biparental y la evolución adaptativa.

La fecundación se inicia cuando el espermatozoide se pone en contacto con las capas que rodean al óvulo. Cuando el contacto es en el medio ambiente la fecundación es externa; si es en el tracto reproductivo de la hembra la fecundación es interna. Subsecuentemente, los principales eventos son: el reconocimiento del óvulo por el espermatozoide, la entrada del espermatozoide en el óvulo, el bloqueo de la polispermia y la fusión de núcleos (Yanagimachi, 1994). Estos procesos requieren que el óvulo y el espermatozoide contengan estructuras altamente especializadas que permitan una fusión exitosa.

## **EL ESPERMATOZOIDE**

El gameto masculino o espermatozoide, como producto final de la espermatogénesis, tiene sólo la mitad del material genético que cualquier célula somática. Cuenta con una estructura altamente especializada para la fecundación en la que destaca el cuerpo celular o cabeza, cuyo tamaño varía de acuerdo a la especie (1 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro), y un flagelo. Como características peculiares encontramos: una vesícula que contiene enzimas líticas llamada acrosoma, situada en la parte anterior de la cabeza; una maquinaria mitocondrial localizada en la pieza media. El flagelo esta constituido por un anillo de 9 pares de microtúbulos que encierran a un par central (axonema). Entre el



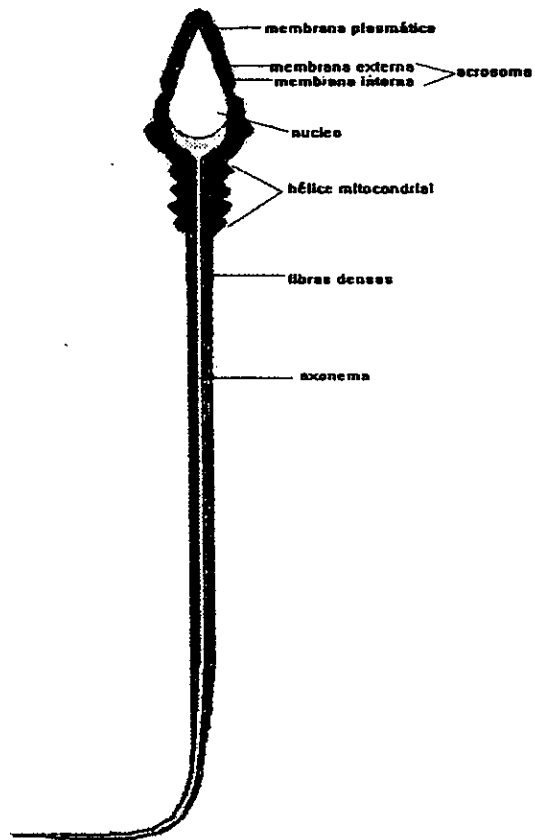


Figura 1.- Esquema básico del espermatozoide de humano. Se puede ver como están organizadas las estructuras en el espermatozoide. El acrosoma, en la parte anterior, seguido del núcleo son elementos de la cabeza; Las mitocondrias, el axonema y las fibras densas, del flagelo.

axonema y la pieza media se encuentran unas fibras densas que se extienden a lo largo del flagelo (Figura 1). Esta célula no tiene ribosomas, retículo endoplásmico ni RNAm por lo que no está facultada para sintetizar proteínas. Este conjunto de estructuras especializadas contiene el abasto energético y las herramientas necesarias para la motilidad y fusión con el óvulo (Alberts, 1989).

## **EL ÓVULO**

El óvulo es una célula de mucho mayor tamaño (80  $\mu\text{m}$ ) que el espermatozoide; contiene todas las estructura típicas de una célula completa (Carlson, 1994). De entre sus características distintivas destacan el pronúcleo, el cuerpo polar, cada uno con la mitad de la información genética, y una serie de vesículas situadas próximas a la membrana plasmática llamadas gránulos corticales, los cuales guardan enzimas líticas.

El óvulo está rodeado por un revestimiento que tiene que atravesar el espermatozoide antes de fusionarse con su membrana plasmática (Monroy, 1969). En invertebrados marinos como el erizo de mar, estas cubiertas constan de una capa de gelatina, la más externa, constituida de mucopolisacáridos, seguida de una cubierta llamada membrana vitelina, de composición mayormente proteica, que es la más próxima a la membrana plasmática (Alberts, 1989). En los mamíferos existe una sola capa que rodea al óvulo denominada zona pelúcida (ZP). La ZP en el ratón está constituida por tres glicoproteínas que se entrecruzan: la ZP1, la ZP2 y la ZP3 (Wassarman, 1988; Wassarman y Mortillo, 1991; Arnoult, et al., 1996b).

## **INTERACCIÓN ÓVULO-ESPERMATOZOIDE**

La interacción del óvulo con el espermatozoide involucra una serie de eventos que dan lugar a la fusión de ambas células. En este proceso el óvulo es capaz de exponer o liberar sustancias que modulan el comportamiento del espermatozoide. En el erizo de mar, por ejemplo, el óvulo secreta un pequeño péptido, "el speract", que activa al espermatozoide (aumenta su respiración bajo ciertas condiciones) y que es quimiotáctico (Schackman y Chock, 1986; Lee y Garbers, 1986). Un componente de la gelatina, que es un polímero de fucosa sulfatado, induce en el espermatozoide la reacción acrosomal de manera más o menos especie específica. Esto trae como consecuencia la liberación de

enzimas líticas que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo. En la membrana vitelina, el espermatozoide se une a un ligando y finalmente se fusiona con el óvulo, membrana a membrana.

En el caso del mamífero, el espermatozoide tiene primero que "capacitarse". La capacitación es un proceso muy complejo que habilita al espermatozoide para la fecundación. Este proceso, que dura varias horas en el tracto genital femenino o, *in vitro*, en un medio con calcio, provoca en el espermatozoide un aumento notable en su movilidad (hiperactivación) y cambios en su patrón de movimiento: pasa de un nado errático a un nado rápido y en línea recta. Durante la capacitación cambian muchas variables de la célula: se activan proteasas, cinasas, aumenta el calcio interno, etc. Una vez capacitado, el espermatozoide es capaz de interactuar con la ZP del óvulo. Es anclado por la ZP3 de manera especie específica (Yanagimachi, 1994) y una vez unido, la misma ZP3 dispara la reacción acrosomal (Florman y Wassarman, 1985; Bleil y Wassarman, 1983).

Cuando el espermatozoide entra en contacto con el óvulo, este último pasa de un estado de letargo a uno extraordinariamente activo con cambios fisiológicos que comienzan, en muchas especies de invertebrados, con una despolarización de la membrana plasmática que impide la unión de más de un espermatozoide (Dale, 1978; Yanagimachi, 1994). Esto constituye el bloqueo temprano de la polispermia que dura segundos. Posteriormente, en decenas de segundos, el espermatozoide dispara en el óvulo un aumento en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) que provoca la exocitosis de los gránulos corticales. Estos gránulos liberan enzimas que modifican a las estructuras que rodean al óvulo inactivando los receptores a los espermatozoides, como la ZP3 en el caso del mamífero o las capas de gelatina y vitelina en el caso del erizo de mar. Esto constituye el bloqueo tardío de la polispermia que se da en minutos (Yanagimachi, 1994; Carlson, 1994) y se presenta tanto en invertebrados como en mamíferos. De este modo, solo un espermatozoide fecunda al óvulo para finalmente dar lugar a la formación del cigoto e iniciar la siguiente etapa en la ontogenia del individuo conocida como embriogénesis.

## LA REACCIÓN ACROSOMAL

En términos generales, la reacción acrosomal (RA) es un evento excitotico que permite la liberación de enzimas líticas para degradar los componentes que rodean al óvulo. Concomitantemente, se expone el lado interno de la membrana del acrosoma que sirve como una nueva superficie de unión con la membrana plasmática del óvulo (Alberts, 1989; Eddy y O'Brien, 1994; Carlson, 1994).

En mamíferos, el acrosoma consta de una membrana interna y una externa que se dividen en un segmento anterior cargado de enzimas y un segmento ecuatorial presumiblemente carente de las mismas. Como componentes principales de la vesícula se encuentran las hialuronidasas, proteasas como la acrosina, carbohidratos y una capa glicoproteica que cubre a la membrana interna del acrosoma. Las hialuronidasas que libera el acrosoma durante la RA antes de llegar al óvulo (reaccionado de manera espontánea o por inducción por progesterona) digieren la matriz del cúmulus y las acrosinas acarreadas a la superficie ayudan en el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida (Eddy y O'Brien, 1994). Las múltiples fusiones entre la membrana externa, rica en sitios de unión a calcio, caracterizan a una verdadera reacción acrosomal ya que así se promueve el escape del contenido acrosomal a través de la membrana (Eddy y O'Brien, Op. Cit.).

En los mamíferos, los espermatozoides capacitados (expuestos al ambiente del tracto reproductivo de la hembra durante un periodo de tiempo) son los que sufren la reacción acrosomal inducida fisiológicamente. Ésta se inicia naturalmente cuando se encuentran frente a estímulos como la glicoproteína ZP3 o la progesterona (Wassarman, 1988; Osman et al., 1989) promoviendo una cascada de eventos que ocasiona un influjo de calcio posiblemente por la apertura de canales iónicos (Florman et al., 1992).

La ZP3 actúa a través de un receptor presente en la membrana plasmática de los espermatozoides (Leyton y Sailing, 1989). Se ha reportado que la ZP3 dispara incrementos en el calcio intracelular (Lee y Storey, 1989), el pH intracelular (Florman, 1989), el AMP cíclico (Noland et al., 1988), el inositol trifosfato (IP3) (Domino y Garbers, 1988; Thomas y Meizel, 1989), y el diacilglicerol (Roldan et al., 1994). La RA se inhibe en medio sin calcio, en presencia de bloqueadores de los canales de calcio del tipo de las

dihidropiridinas o bloqueadores inorgánicos como el níquel y por la toxina pertusis (TxP) (inhibidor de la proteína Gi).

Por otra parte, en la ausencia de ZP3 o progesterona, otros estímulos como la adición de ionóforos de calcio, despolarizaciones de la membrana con altas concentraciones de potasio y pH (Florman et al., 1992; Zeng et al., 1995), N-acetilglucosamina y residuos de manosa (Brandelli et al., 1996) también pueden inducir la exocitosis del acrosoma en espermatozoides de mamíferos con un aumento concomitante en el calcio y el pH intracelulares ( $pH_i$ ). Esto pone de manifiesto la importancia de la regulación del calcio intracelular y el pH intracelular en el disparo de la reacción acrosomal.

La evidencia de un aumento en la actividad de GTPasa inducida por la ZP bloqueable por TxP, ha sugerido que una proteína Gi reguladora (Bentley et al., 1986. Kopf et al., 1986) podría estar involucrada en la elevación del calcio interno que ocurre durante la RA. Asimismo, la ZP3 también despolariza la membrana plasmática por otra vía insensible a TxP que tiene características de un canal catiónico pobremente selectivo (Arnoult et al., 1996b). La elevación del calcio intracelular y el incremento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados presentan dosis respuesta similares cuando se despolariza con  $K^+$  y se aumenta el pH, además se inhiben por bloqueadores de canales de calcio dependientes del voltaje como nifedipina, verapamil,  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ; esto ha llevado a proponer la existencia de canales de calcio dependientes de voltaje como un evento que sería subsecuente a la activación de la vía de la fosfolipasa C (Florman et al., 1992). Asimismo, en base a experimentos hechos con microscopía de epifluorescencia e indicadores de pH y calcio, se tienen indicios de la presencia de un eflujo de protones durante la reacción acrosomal inducida por ZP3 en el espermatozoide de ratón (Lee y Storey, 1989).

En lo referente a las señales generadas por progesterona, ésta induce un incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides no capacitados y sostenido en espermatozoides capacitados (Osman, et al. 1989; Balckmore et al., 1990). La progesterona actúa a través de un receptor no genómico posiblemente ligado a un sistema de transducción de señales diferente al del receptor ZP3, como lo sugiere el

hecho de que la RA inducida por la progesterona no es sensible a la toxina pertusis. La progesterona también induce una despolarización de la membrana plasmática posiblemente debida a la apertura de un canal catiónico inespecífico (Foresta et al. 1993). Como sucede con la ZP, la RA inducida por progesterona también se inhibe con bloqueadores de canales de calcio, lo que ha llevado a la hipótesis de que al menos una de las vías de permeabilidad a calcio que abre la progesterona sería un canal de calcio dependiente del voltaje.

Las características y el acople entre los diferentes eventos que definen a la reacción acrosomal aún no están bien definidas. De aquí que las condiciones iónicas intracelulares que inician la exocitosis del acrosoma, los sistemas de transporte y su regulación bioquímica por segundos mensajeros sean los temas de mayor importancia en el estudio de la reacción acrosomal sobre todo por sus posibles implicaciones clínicas. Por ejemplo, se ha observado que las dihidropiridinas administradas como antihipertensivos a pacientes hipertensos causan esterilidad reversible en el hombre; se piensa que esto se debe a un presunto bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje que estarían presentes en el espermatozoide, sin embargo, esto no se ha comprobado.

De lo presentado hasta aquí, las evidencias apuntan hacia la posibilidad de encontrar canales de calcio dependientes del voltaje que pudieran intervenir en la cascada de eventos que determinan a la RA inducida por ZP3 y/o por progesterona. Si bien hay indicios claros que sugieren que durante la RA se activan canales de calcio dependientes de voltaje y modulados por  $\text{pH}_i$  en el ratón y el bovino, aún no se ha demostrado claramente la presencia de estos canales, particularmente en el espermatozoide humano. Con el fin de aportar información que contribuya al esclarecimiento de estas interacciones se establecieron los siguientes objetivos.

## **II.OBJETIVOS**

1. Determinar si el espermatozoide de humano esta provisto de canales de calcio dependientes de voltaje y su posible implicación en la reacción acrosomal.
2. De cumplirse la condición anterior, determinar algunas características del flujo de calcio como su dependencia de voltaje, bloqueo e inactivación.
3. Investigar el efecto del pH intracelular en el incremento del calcio intracelular inducido por la despolarización de la membrana plasmática y el comportamiento del mismo en condiciones despolarizantes.

## **III.METODOLOGÍA**

### **REACTIVOS**

Los colorantes fluorescentes: Yoduro de 3,3'- dipropiltiodicarbocianina (DiSC3(5)); 2',7'-bis(2-carboxietil-5-carboxifluoresceina,acetoximetilester (BCECF-AM) y fura-2 -AM se adquirieron de Molecular Probes. El solvente dimetil sulfóxido (DMSO), el percol, los ionóforos (ionomicina, valinomicina, nigericina y A23187), los bloqueadores (nifedipina y cloruro de níquel) y las sales utilizadas fueron de SIGMA Chem. Co.

### **PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **1.AISLAMIENTO DE ESPERMATOZOIDES**

Las muestras de los espermatozoides fueron donadas por hombres sanos de entre 18 y 25 años de edad con 3 días de abstinencia sexual como mínimo. Las muestras fueron sometidas a las pruebas de espermatobioscopia como se indica en el manual de laboratorio de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1987) para su posterior selección.

## **II.OBJETIVOS**

1. Determinar si el espermatozoide de humano esta provisto de canales de calcio dependientes de voltaje y su posible implicación en la reacción acrosomal.
2. De cumplirse la condición anterior, determinar algunas características del flujo de calcio como su dependencia de voltaje, bloqueo e inactivación.
3. Investigar el efecto del pH intracelular en el incremento del calcio intracelular inducido por la despolarización de la membrana plasmática y el comportamiento del mismo en condiciones despolarizantes.

## **III.METODOLOGÍA**

### **REACTIVOS**

Los colorantes fluorescentes: Yoduro de 3,3'- dipropiltiodicarbocianina (DiSC3(5)); 2',7'-bis(2-carboxietil-5-carboxifluoresceina,acetoximetilester (BCECF-AM) y fura-2 -AM se adquirieron de Molecular Probes. El solvente dimetil sulfóxido (DMSO), el percol, los ionóforos (ionomicina, valinomicina, nigericina y A23187), los bloqueadores (nifedipina y cloruro de níquel) y las sales utilizadas fueron de SIGMA Chem. Co.

### **PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **1.AISLAMIENTO DE ESPERMATOZOIDES**

Las muestras de los espermatozoides fueron donadas por hombres sanos de entre 18 y 25 años de edad con 3 días de abstinencia sexual como mínimo. Las muestras fueron sometidas a las pruebas de espermatobioscopia como se indica en el manual de laboratorio de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1987) para su posterior selección.



## **PURIFICACIÓN DE LOS ESPERMATÓZOIDES**

Las muestras de semen se procesaron individualmente. La separación fue realizada mediante gradientes de percol que consistió en añadir a un tubo cónico 1 mililitro de una solución de percol al 75% preparado con HEPES 10 mM y NaCl 0.150 M a un pH de 7.5, seguido de otro mililitro de percol al 50% con el mismo contenido de HEPES y NaCl y al mismo pH. Encima del gradiente se puso uno o dos mililitros de la muestra de semen previamente licuada durante 20 min a 37°C. Después se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min, a temperatura ambiente, al término del cual el sobrenadante, sólo la capa superior que está antes de la interface de los gradientes de percol, fue desechado. Para liberar a los espermatozoides de cualquier traza de percol, se lavaron con Human Sperm Medium (HSM) de composición milimolar como sigue: NaCl 117, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, KCl 8.6, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 0.49, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucosa 2, piruvato de sodio 0.25, lactato de sodio 19, a pH de 7.5-7.6. Para los registros de fluorescencia se usó el mismo medio (Suárez et al. 1986) modificado con 25mM de HEPES en lugar de NaHCO<sub>3</sub> (H-HSMm) y sin piruvato de sodio, ni lactato de sodio. Por último se resuspendieron en 1 ml del mismo medio y se mantuvieron en un medio con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire a 37°C para dar paso a las pruebas fluorométricas.

## **ESPERMATOBIOSCOPIA**

Con esta prueba se examinó el estado de las muestras de semen y su contenido espermático, que cuando fue normal, presentó un color blanco grisáceo y se licuó en aproximadamente 20 a 60 minutos a temperatura ambiente después de lo cual se midió el volumen total del eyaculado (2-4 ml).

La consistencia o viscosidad se determinó observando la longitud del filamento (> 2 cm de longitud para muestras normales) al examinar con una varilla de vidrio la muestra ya licuada. El pH se midió en el transcurso de una hora a partir de que se obtuvo la muestra, cuyos valores variaron entre 7.2 y 7.8.

Para evaluar la motilidad se examinó, en un microscopio óptico a un aumento de 400x, una gota de espermatozoides purificados y se clasificaron bajo las siguientes categorías: motilidad progresiva cuando el movimiento descrito fue lineal y hacia el frente; errática cuando fue con movimientos circulares; *in situ* cuando no avanzan, e inmóviles.

Se seleccionaron aquellas muestras con más del 50% de motilidad progresiva y 25% *in situ*.

La concentración de espermatozoides fue medida por el método del hemocitómetro tomando una alícuota de semen fresco a un aumento de 400x en el microscopio óptico. En esta misma preparación se evaluó la presencia de leucocitos u otro tipo de elementos celulares. En las muestras usadas, éstos no excedieron de 1 millón por ml en el semen.

La unión entre espermatozoides se denomina aglutinación. Ésta también se estimó por observación al microscopio óptico y se rechazaron las muestras con evidente grado de aglutinación.

Una última prueba, la de viabilidad, se realizó utilizando el método de tinción supravital eosina-nigrosina y contando 100 espermatozoides diferenciando los vivos (coloreados) de los muertos (no teñidos). Las tinciones para el microscopio óptico se hicieron con una gota de semen mezclada con 2 gotas de eosina al 1 % y treinta segundos más tarde 3 gotas de nigrosina al 10 % con lo que se hizo un frotis para determinar el porcentaje de viabilidad. Según la OMS (1987) aquellas muestras con 60 % de viabilidad o más se consideran normales.

## **2.MEDICIONES FLUOROMÉTRICAS**

### **DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE $[Ca^{2+}]_i$ Y POTENCIAL DE MEMBRANA**

Los espermatozoides ( $1-2 \times 10^6$ ) cargados con fura-2 (ver adelante) se añadieron a una celda con 2 ml de medio H-HSMm y  $0.5 \mu M$  de colorante para potencial de membrana DiSC3(5). Las células se mantuvieron bajo agitación constante a  $37^\circ C$ . Las mediciones de fluorescencia fueron hechas en el equipo de PTI (Photon Technology International). Las longitudes de onda de excitación utilizadas para la radiometría<sup>1</sup> (ver adelante) de fura-2 fueron de 340/380 nm en el monocromador y sus emisiones fueron rescatadas por un filtro para longitud de onda de 488 nm y detectada por un fotomultiplicador PTI814. Las emisiones del DiSC3(5) fueron tomadas por el filtro de 670 nm tras la excitación del mismo por la lámpara de haluro adicional con el filtro de 600 nm y detectadas por el otro fotomultiplicador PTI810. La señales se digitalizaron con la interface

---

<sup>1</sup> El término radiometría en este texto se refiere a la relación entre las medidas de fluorescencia.

del mismo equipo PTI a 1.2 Hz (figura 2). La duración de los registros duales fue de 400 segundos para cada experimento.

### **MEDICIÓN Y CALIBRACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$**

Para la determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , se tomaron  $1-2 \times 10^8$  espermatozoides en un volumen de 1ml y se incubaron con el colorante fura-2 AM  $3 \mu M$  por espacio de una hora a  $37^\circ C$  en 5 % de  $CO_2$  y 95 % de aire, tiempo al cual se lavaron del exceso de colorante por centrifugación con H-HSMm durante 10min a 2000 rpm, el paquete con aproximadamente 100-200 millones de espermatozoides fue resuspendido en 200  $\mu l$  del medio H-HSMm del cual se tomaron alícuotas de 20  $\mu l$  que se llevaron a un volumen final de 2 ml del mismo medio en la celdilla del aparato. El radio de fluorescencia de  $[Ca^{2+}]_i$  fue obtenido por la relación de las longitudes de onda de Excitación antes mencionadas (340/380 nm) dadas por el monocromador ajustado a 1.2 Hz y recogidas a una sola longitud de onda de emisión (488 nm). Los radios fueron calibrados de acuerdo a Grynkiewicz et al. (1985) utilizando la ecuación  $[Ca^{2+}]_i = K_d(R-R_{min})/(R_{max}-R) (F_{f380}/F_{b380})$ . Los valores de radiometría máxima (R max) y fluorescencia unida (Fb380) fueron obtenidas tras la saturación de calcio intracelular por la adición de  $1 \mu M$  de ionomicina y fueron 6.54 y 2.28, respectivamente (Figura 3). La radiometría mínima (Rmin) y la fluorescencia libre (Ff380), es decir, la fluorescencia en ausencia de calcio, se determinaron varios minutos después de la adición de 15 mM de EGTA (solución stock a pH 9 para evitar la acidificación del medio H-HSMm). Estos valores fueron Rmin = 0.9 y Ff = 8.9. La constante de disociación,  $K_d$ , para el calcio fue de 224 nM tomada de Grynkiewicz et al. (1985).

### **CALIBRACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA**

La señal de potencial de membrana ( $V_m$ ) se registró como cambio en la fluorescencia (incremento o decremento) del colorante DiSC3(5), que se presenta por su redistribución entre los espacios interno y externo de la célula en respuesta al voltaje. Las emisiones de fluorescencia se calibraron de acuerdo a lo reportado por García Soto et al. (1987) induciendo un potencial electroquímico con  $1 \mu M$  de valinomicina (ionóforo de  $K^+$ ) a diferentes concentraciones de  $K^+$  en el medio extracelular. Los valores de fluorescencia

**Sistema para medir simultáneamente calcio intracelular y potencial de membrana**

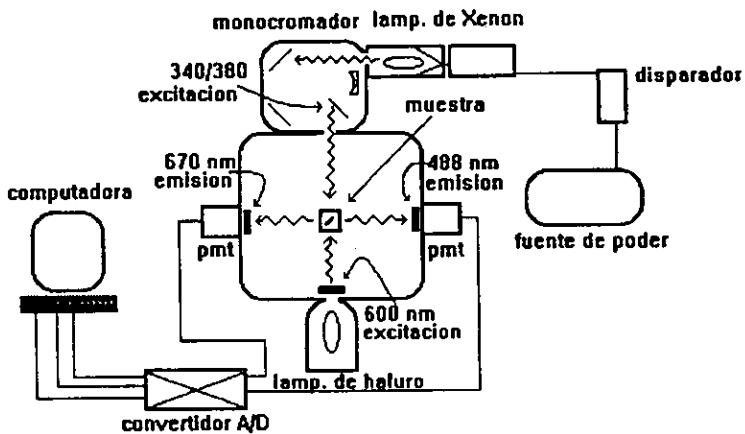


Figura 2.- Representación esquemática del sistema de detección de fluorescencia simultánea. Aquí se ilustra la posición del monocromador con respecto a la celdilla y a la fuente de xenón. La lámpara adicional se encuentra frente a la ventana de excitación del monocromador y en ángulo recto con respecto a los filtros de emisión. El sistema de agitación se adaptó en la parte inferior de la celdilla la cual cuenta con un termostato incluido en el equipo.

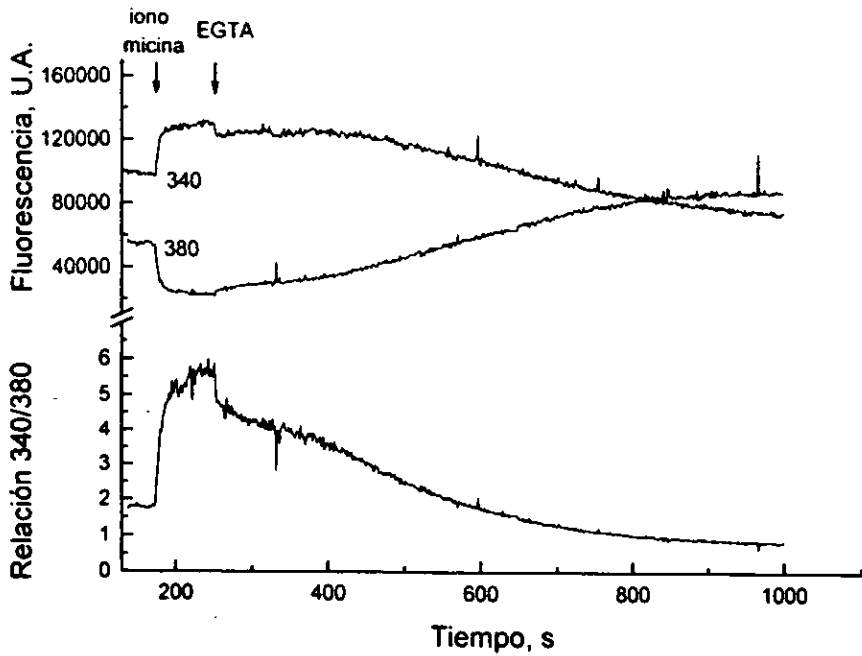


Figura 3.- Ventanas de registro para la calibración de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Después de añadir los espermatozoides se adquieren las líneas basales de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo mismo en las emisiones a 340/380 nm de excitación (parte superior) que para el radio (relación) (parte inferior). La fluorescencia mínima de calcio interno se determina por quelación de calcio con EGTA. Estos datos fueron aplicados ( $n=5$ ) en la fórmula para la transformación a nM de calcio (Grynkiewicz et al. 1985).

fueron adquiridos en un rango de concentraciones de  $K^+$  externo ( $[K^+]_{ext.}$ ) de 2-68.6 mM y aplicados en la ecuación de Nernst para calcular el potencial electroquímico ( $E_k$ ) para la distribución de  $K^+$  a 37°C :

$$E_k = -61.54 \text{ mV} \log [K^+]_{in} / [K^+]_{ext.}$$

La concentración interna de  $K^+$  ( $[K^+]_{in}$ ) fue de 120 mM; se obtuvo según se describe más adelante.

Cabe señalar que cuando la mitocondria está funcionando de manera acoplada genera un potencial negativo que puede detectar la cianina (García Soto et al. 1987). Al colapsar la mitocondria con cianuro o ionóforos de protones como el CCCP, ocurre un aumento en la fluorescencia asociado precisamente a este colapso. En el espermatozoide humano, encontramos que en la mayoría de los casos y en el lapso aproximado de dos horas de incubación con el CCCP (0.4  $\mu$ M) y el cianuro (1mM) no afectaron la fluorescencia de la cianina lo que indicó que el potencial mitocondrial fue cercano a cero. Las señales de calcio y potencial de membrana fueron calibradas una en presencia de la otra para mayor precisión de las medidas obtenidas en los registros simultáneos.

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POTASIO INTRACELULAR**

La concentración de potasio intracelular ( $[K^+]_i$ ) se calculó mediante el método del "null point" (Babcock, 1983) con el fin de aplicarla a la ecuación de Nernst y poder cuantificar el potencial de membrana.  $1 \times 10^8$  espermatozoides fueron cargados con 3 $\mu$ M del colorante para pH, BCECF-AM en un volumen de 1ml de H-HSMm durante cuarenta minutos a 37°C con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lavadas por centrifugación para liberarlas del exceso de colorante. Después  $1.5 \times 10^8$  células se adicionaron a la celda con 2 ml de medio compuesto por: 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de glucosa y concentraciones de 100-230 mM de LiCl. La fuerza iónica se mantuvo constante cuando al sustituir el KCl y el NaCl por LiCl se sumó un total de 130 mM. El pH fue amortiguado con una solución de HEPES-Li 10 mM a 6.8-6.9 (pH al que se encuentra el medio intracelular). El pH<sub>i</sub> se determinó por radiometría de Excitación; las emisiones se recogieron con el filtro de 550 nm; las excitaciones fueron de 500 y la del punto isosbético 439 nm. En estas condiciones un intercambio  $K^+ - H^+$  fue inducido con 2  $\mu$ M de nigericina. Cuando la concentración de potasio interno fue mayor que el externo, la

nigericina sacó potasio y metió protones, acidificando. Contrariamente, cuando la concentración de potasio interno fue menor que el externo, la nigericina metió potasio y sacó protones, alcalinizando el pH interno. El punto en el cual no se detectó cambio en el  $pH_i$  (null point) cuando se puso la nigericina fue con una concentración de  $K^+$  externo de 120 mM (figura 6) lo que correspondió a la concentración interna de  $K^+$ . Estos resultados coincidieron con los reportados por Babcock (1983) para el espermatozoide de bovino.

#### **REGISTRO Y CALIBRACIÓN DEL pH INTRACELULAR**

Los registros simultáneos de  $pH_i$  y  $V_m$  se obtuvieron de la misma manera que los simultáneos de calcio y  $V_m$  sustituyendo a las células marcadas con fura-2 por células marcadas con BCECF a las excitaciones y emisiones correspondientes a las de  $pH_i$ , descritas en el párrafo anterior. Las condiciones de cargado para BCECF-AM fueron las mismas que para el fura-2-AM. La señal de  $pH_i$  se calibró comparando la fluorescencia de BCECF y el pH del medio (modificado con HCl o NaOH) después de permeabilizar a las células con Triton x-100 al 0.05 %, con lo que se obtuvo una curva que se aplicó para transformar la fluorescencia a valores de pH (Figura 4).

#### **3.INDUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL**

Para determinar el porcentaje de espermatozoides reaccionados bajo condiciones de despolarización de la membrana plasmática. Se dividió 1 ml de la muestra, ya purificada, en 5 partes y se les aplicaron los siguientes tratamientos: ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 (10  $\mu$ M) como control positivo, 60 mM de KCl, valinomicina  $1\mu$ M+60 mM de KCl, sólo valinomicina y 2  $\mu$ l de DMSO como control negativo. Posteriormente se incubaron a 37°C, 5 % de  $CO_2$  y 95 % aire durante 20 min (Tesarik et al. 1993) en H-HSM.

Después del tiempo de incubación se lavaron por centrifugación 2 veces a 2000 rpm durante 5 min con H-HSM libre de proteínas (Mendoza et al. 1992). Cada paquete de células fue resuspendido en 100  $\mu$ l del mismo medio. Los frotis para cada tratamiento se hicieron tomando una alícuota de las células resuspendidas en 100  $\mu$ l de medio y se dejaron secar al ambiente. Inmediatamente después fueron sumergidos durante 30 segundos en metanol absoluto para permeabilizar la membrana plasmática.

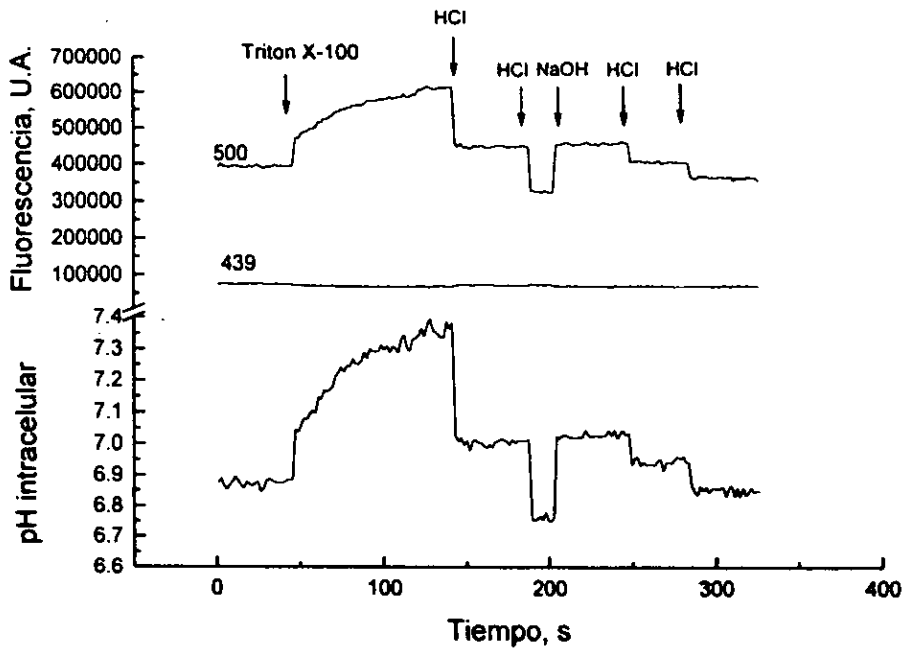


Figura 4.- Calibración del pH, en H-HSMm con el marcador fluorescente de pH, BCECF. La parte inferior muestra la curva transformada a valores de pH, que se obtuvo de las fluorescencias a 550 nm, adquiridas excitando a 500 y 439 nm (punto isobéptico) (gráfica superior). Después de la lisis de las membranas de los espermatozoides con Triton X-100 al 0.05%, se varió el pH con HCl o NaOH y se determinó el pH de la muestra con un electrodo de pH.



La tinción de los frotis, resguardados de la luz a temperatura ambiente, se hicieron en el transcurso de los días siguientes sin dejar pasar más de 5<sup>o</sup> días. 50 µg/ml de lectina de *Phisum sativum* marcados con fluoresceina (FICT), diluidos en PBS 1:10, fueron añadidos directamente sobre el frotis y después de esparcirla uniformemente se dejó incubar en una cámara húmeda durante 30 min. Concluido este tiempo, los frotis se lavaron con agua destilada y una vez más se dejaron secar al ambiente. El FICT se une a glicoproteínas de espermatozoides reaccionados por lo que es posible visualizar éstos por epifluorescencia.

La evaluación de la reacción acrosomal se realizó por microscopía de epifluorescencia (Tesarik, et al. 1993) clasificando a 100 espermatozoides bajo los siguientes patrones de fluorescencia:

- A.-En más de la mitad de la cabeza del espermatoziode (acrosoma intacto)
- B.-En casi todo el espermatozoide (espermatozoides muertos)
- C.-Sin fluorescencia en el acrosoma (espermatozoides con RA)
- D.-Fluorescencia parcial o limitada en el segmento ecuatorial (RA).

(Mendoza, et al., 1992; Tesarik, et al., 1993).

#### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados expresados en porcentaje de espermatozoides reaccionados fueron comparados aplicando la prueba estadística de Dunnett con un nivel de significancia (P) menor de 0.05.

## IV.RESULTADOS

En los registros simultáneos de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$  (figura 5) se puede apreciar que cuando se añadió  $0.5 \mu M$  de DiSC3(5) al medio no se alteró la señal de lectura del calcio intracelular a  $488 \text{ nm}$ , del mismo modo la adición de espermatozoides cargados con fura-2 no interfirió con la señal registrada a  $670 \text{ nm}$ . Ambas señales respondieron favorablemente a la adición de los espermatozoides, la fluorescencia del DISC3(5) presentó un lento decremento dado por una lenta captación electroforética de las que se estabilizó en 3 min; este valor corresponde al potencial de reposo de la membrana plasmática. El valor del calcio intracelular detectado por la radiometría (ver metodología) fue, en este experimento, de  $120 \text{ nM}$  y se estabilizó en 1 min. Tras la adición de valinomicina, los registros de potencial y calcio intracelular se manifestaron como una hiperpolarización en el primero (decremento en la fluorescencia del colorante) y como un ligero incremento en el nivel basal de calcio intracelular en el segundo. La subsecuente aplicación de  $60 \text{ mM}$  de KCl, causó un incremento transitorio en el calcio intracelular y una despolarización de la membrana plasmática. Los registros separados de calcio intracelular y  $V_m$  (no mostrados) fueron semejantes a los observados en el registro simultáneo; esto indicó que el fura-2 y la cianina pueden usarse simultáneamente. Asimismo, la elevación de calcio y la despolarización inducida por potasio sugirió fuertemente la presencia de un influjo de calcio dependiente del voltaje. En este sentido, decidimos caracterizar este influjo de calcio más detalladamente y determinar: su dependencia de voltaje, sus características farmacológicas y su inactivación.

### DEPENDENCIA DEL VOLTAJE

#### Calibración del registro fluorométrico del potencial de membrana.

Con el fin de determinar la dependencia del voltaje primero determinamos la concentración del potasio intracelular, necesaria para aplicar la ecuación de Nernst (ver Métodos). La figura 6 muestra los trazos correspondientes a la determinación de  $K^+$  intracelular. El valor basal de  $pH_i$  se mantuvo en 6.7 y el intercambio  $K^+-H^+$ , inducido por nigericina a favor del gradiente químico, se da en todos los trazos: acidificante por debajo de  $120 \text{ mM}$  y alcalinizante por arriba de este valor. Con  $120 \text{ mM}$  de KCl en el medio no se

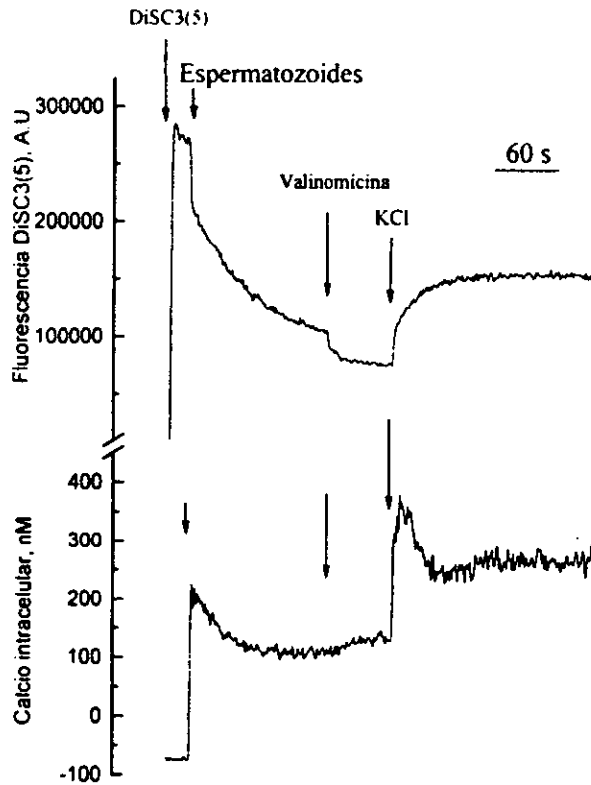


Figura 5.- Registro simultáneo de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides de humano no capositados. En la parte superior se muestra la fluorescencia (Unidades Arbitrarias) de 500 nM de DiSC3(5) a 600-670 nm (Ex-Em) adicionados a la celdilla de fluorescencia con 2 ml de H-HSMm. En la parte inferior, la concentración de calcio intracelular (nM) obtenida a partir de la relación de fluorescencia para fura-2 a 488-340/380 nm (Em-Ex). Ambas curvas se obtuvieron simultáneamente como se describe en la metodología. Se añadieron después los espermatozoides cargados con fura-2, 1  $\mu$ M de valinomicina y 60 mM de KCl como se indica.

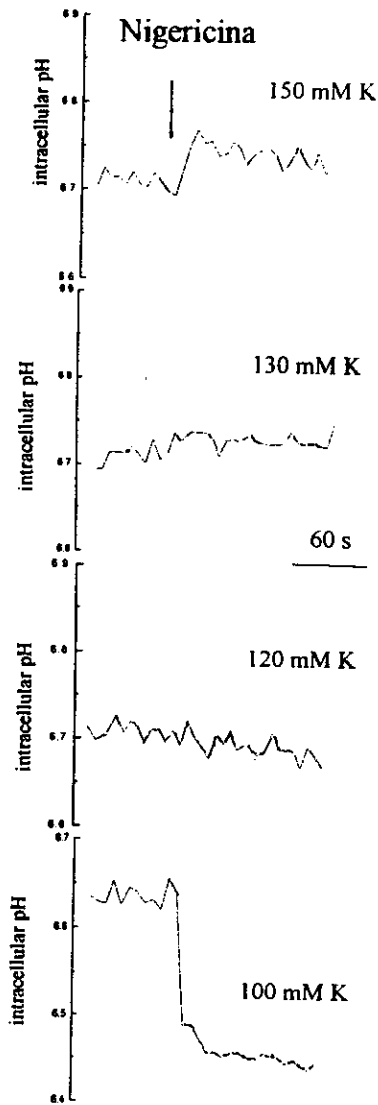


Figura 6.- Determinación de la  $[K^+]_i$  por el método del "null point" de Babcock (1993) donde se promueve un intercambio  $K^+-H^+$  por  $2 \mu M$  de nigericina detectado como cambio de  $pH_i$ . Del rango de concentraciones de KCl utilizadas la que corresponde a la  $[K^+]_i$  es la de 120 mM "null point" (n=2).

presentó ningún cambio lo que significa que no hay gradiente de  $K^+$ . Esta concentración de KCl corresponde a la del "null point" e indica la concentración de  $K^+$  interno del espermatozoide (Babcock, 1983). Este dato fue tomado para estimar el  $V_m$  mediante la aplicación de la ecuación de Nerst para el  $E_k$ .

Los valores de calibración del potencial membranal se tomaron como % de fluorescencia vs.  $E_k$  (figura 7). Los porcentajes de fluorescencia se determinaron a partir de la diferencia entre la intensidad de la fluorescencia tras la adición de las diferentes concentraciones de KCl (en presencia de valinomicina) y la fluorescencia obtenida con valinomicina en medio H-HSMm (8.6 mM  $K^+$ ) dividida entre esta última y multiplicada por 100. Se obtuvo una relación lineal de  $-70$  a  $-14$  mV (con un coeficiente de correlación  $r=0.997$ ) con dos puntos a  $-91$  y  $-109$  mV que se salen de esta línea. La pendiente de la línea recta corresponde a un cambio de 1.5 en el porcentaje de la fluorescencia por cada mV concordante con lo reportado por otros autores (García Soto et al., 1987). Estos valores indican que los alcances de este método permiten estimar semicuantitativamente el valor del potencial de membrana de los espermatozoides de humano siempre que este punto esté incluido en la línea recta. Así, el voltaje estimado para el  $V_m$  al reposo, que corresponde a la fluorescencia antes de la adición de valinomicina, fue de  $-40 \pm 16$  mV ( $n=7$ ).

La dependencia de voltaje del flujo de calcio se indagó suministrando diferentes pulsos de voltaje con la adición de 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 mM de KCl a la celdilla con células en medio H-HSMm un minuto después de hiperpolarizar a la membrana con  $1 \mu M$  de valinomicina. Estos registros simultáneos de calcio y potencial de membrana demostraron que incluso la mínima concentración de KCl utilizada (3.75 mM) indujo un ligero incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que en la figura 8 corresponde a una elevación de 40 nM sobre el nivel basal. El comportamiento del calcio intracelular en respuesta al cambio en el  $V_m$  dado por las concentraciones de KCl mencionadas y confirmadas por el cambio concomitante detectado por la cianina muestra un incremento gradual dependiente de voltaje (figura 8). Los datos del  $E_k$  en milivoltios fueron determinados a partir de los valores teóricos para el  $E_k$ . Los pulsos de despolarización aplicados a la membrana plasmática para determinar la dependencia de voltaje fueron tomados considerando los

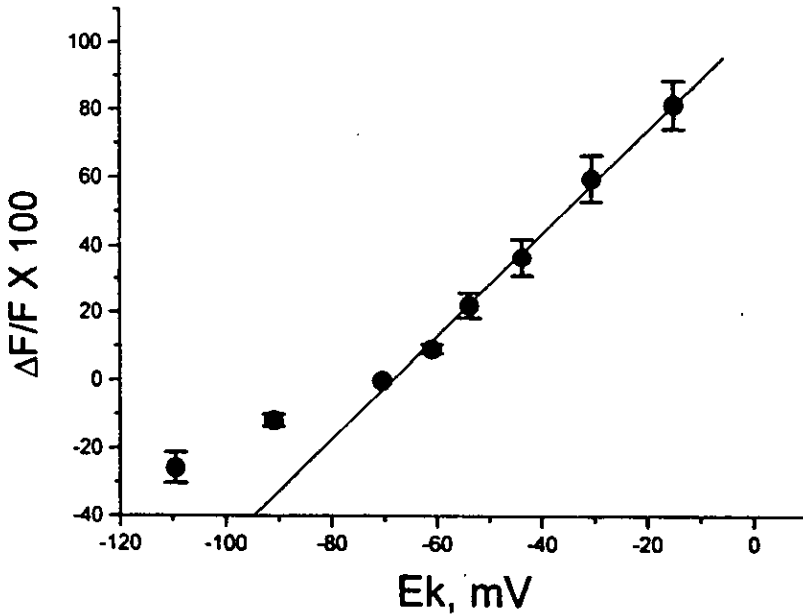


Figura 7.- Transformación de la intensidad de la fluorescencia a valores de potencial de membrana en mV. La gráfica corresponde a la calibración del Vm. La pendiente indica el porcentaje de fluorescencia por cada mV de cambio en el potencial de la membrana plasmática (1.57) con una relación lineal de -70 a -15. Los cambios a -92 y -102 no caen dentro de esta relación por lo que no se tomaron como los límites inferiores del sistema de detección. Cada punto graficado junto con su error estándar fue tomado de una n=7 ( $r=0.997$ ).

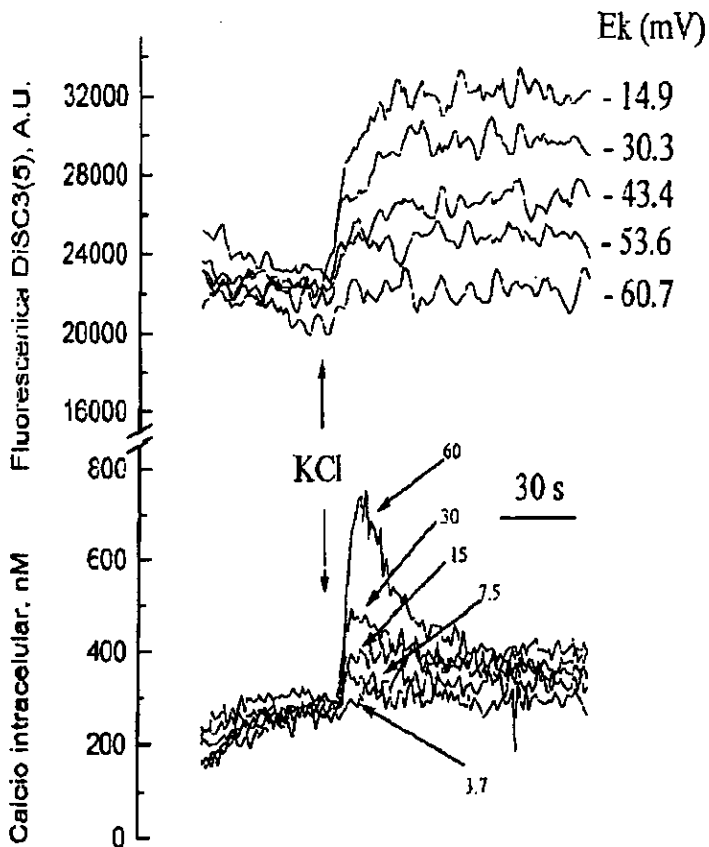


Figura 8.- Comportamiento de las curvas de calcio intracelular en relación al voltaje. Las concentraciones (mM) de KCl indicadas se adicionaron 1 minuto después de la valinomicina ( $1\mu\text{M}$ ). Los  $V_m$  en mV a los que llega la membrana con cada aplicación aparecen al lado derecho de cada línea.

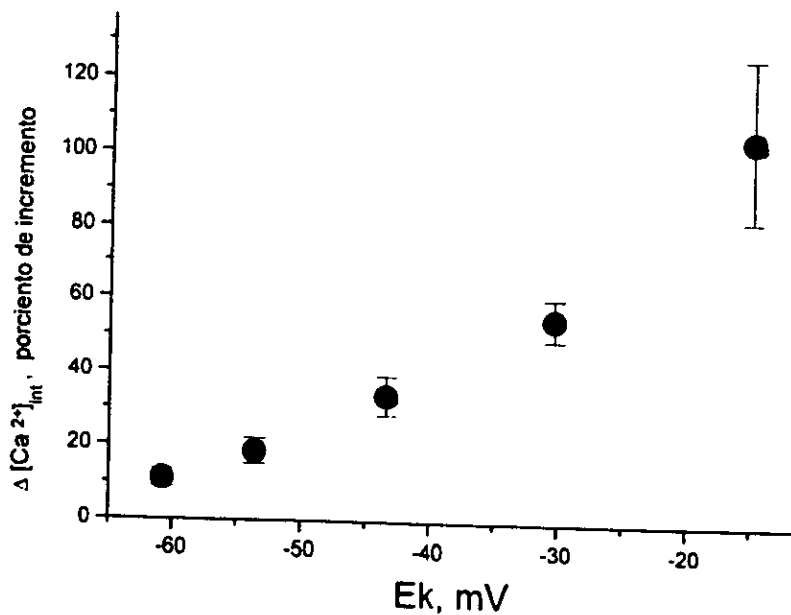


Figura 9.- Dependencia al voltaje del influjo de calcio. La gráfica presenta el porcentaje de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , con respecto al pulso de despolarización aplicado a partir de potenciales de membrana de  $-70mV$  ( $n=5$ ). El incremento es gradual pero no lineal. Las medias graficadas y sus errores estándar provienen de una  $n$  de 6.



valores incluidos en la relación lineal de la curva de calibración para  $V_m$  de la figura 7 (-14.9 a -60.7 mV).

La gráfica de la figura 9 muestra que el porcentaje de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , obtenido por la diferencia en la  $[Ca^{2+}]_i$  del nivel basal y el inducido por la despolarización dividido entre el primero y multiplicado por 100, es dependiente del valor de  $E_k$  (mV). Despolarizaciones que llevan al  $V_m$  de -70 a -14.9 mV provocan una elevación transitoria en el calcio intracelular de  $104 \pm 22 \%$  ( $n=5$ ) con respecto al nivel basal de calcio intracelular y va disminuyendo conforme disminuye el pulso de voltaje aplicado (en una relación no lineal) hasta el último punto adquirido con -60.7 mV de voltaje con un porcentaje de respuesta de  $11.34 \pm 2.32 \%$  ( $n=5$ ).

Hasta aquí los resultados demuestran la existencia de una vía de permeabilidad a calcio que es activada por voltaje. Con el propósito de evaluar esta vía de permeabilidad bajo condiciones fisiológicas se hicieron registros simultáneos de  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  intracelular en ausencia y presencia de valinomicina. El trazo representativo se presenta en la figura 10 donde se observa que la adición de KCl 60 mM a potenciales de reposo de  $-40 \pm 16$  mV llevan al  $V_m$  casi al mismo valor que con la adición de la misma concentración de KCl después de una hiperpolarización a -70 mV con valinomicina (a y b respectivamente). A pesar de ello, en los registros de calcio en esta figura, se manifiesta una clara diferencia entre aquel trazo en el que la membrana se encontraba en un estado hiperpolarizado (b') y en el que el  $V_m$  se encontraba en reposo (a'), pues, en el primero la elevación transitoria en la  $[Ca^{2+}]_i$  fue 4 veces mayor que en el segundo en el que el incremento fue casi imperceptible. De este hecho se supone la necesidad que tiene la membrana de encontrarse en un estado hiperpolarizado (al  $E_k$  en concentraciones normales de  $K^+$  externo) para que los canales de calcio dependientes de voltaje puedan ser activados.

Para averiguar si el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  dependiente de voltaje presentaba algún signo de inactivación, se investigó la dependencia del flujo de calcio a diferentes potenciales de reposo de la membrana que se consiguieron con la incubación de las células en la celdilla del fluorómetro con H-HSMm a diferentes concentraciones de KCl (2, 4, 8, 16 y 32 mM). Estos "prepulsos" de voltaje (Hille, 1992), con la ayuda de valinomicina,

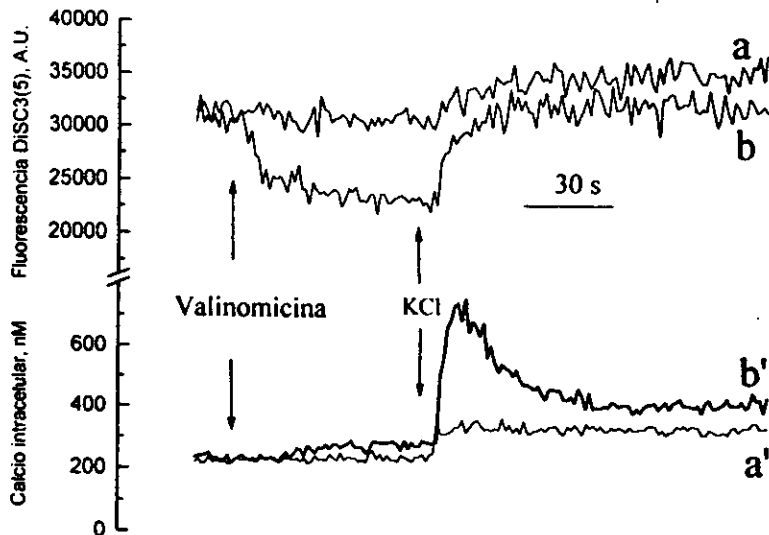


Figura 10.- Comparación de las espigas de calcio detectadas en condiciones fisiológicas con las registradas después de una hiperpolarización. a y a' trazo de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ , respectivamente con el  $V_m$  al reposo (sin valinomicina) y su reacción frente a la aplicación de un pulso de voltaje. b y b', los mismos datos para mV y calcio pero moviendo con valinomicina el  $V_m$  al  $E_k$  ( $-70mV$ ). Los trazos se hicieron en condiciones de  $K^+$  externo normales.

llevaron a diferentes valores de reposo al  $V_m$  (figura 11) que tras la aplicación de pulsos de voltaje (adicionando la cantidad restante de KCl para llegar a 62 mM) elevaron al  $E_k$  hasta  $-17.6$  mV. En la misma figura se puede reconocer una variación en la  $[Ca^{2+}]_i$  en función del potencial de reposo: a potenciales de reposo más negativos el calcio adquiere la mayor elevación en su concentración y viceversa a potenciales de reposo menos negativos las respuesta de calcio son menores. Esta relación también está gráficamente representada en la figura 12 donde los promedios de 5 registros del mismo tipo y sus desviaciones estándar (ambos representados en % de decremento en el calcio) fueron dependientes del  $E_k$  al reposo expresado en mV. Cabe mencionar que en la fluorescencia del DiSC(3)5 a valores de potencial membranal de reposo entre  $-109$ ,  $-94$  y  $-70$  mV no existe una clara diferencia (2,4 y 8 mM de  $K^+$  en el medio respectivamente) lo que concuerda con lo reportado en la curva de calibración del  $V_m$  como resultado de una falta de linealidad en el % de fluorescencia a valores de  $V_m$  tan negativos ( $-109$  y  $-94$  mV). Pese a esta limitación técnica, se pudo indagar acerca de un posible estado de inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje, ya que los puntos de la gráfica marcan una tendencia a disminuir conforme el  $V_m$  de reposo se hace más positivo. Así tenemos que, prepulsos a  $-109$ ,  $-94$  y  $-70$  mV de  $V_m$  en el reposo provocan respuestas, en el calcio de 100-80 % de incremento. Mientras que potenciales de reposo de  $-53$  y  $-35.3$  incrementan la concentración de calcio intracelular en un 60 y 40 % respectivamente.

### **CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA**

Con el objeto de averiguar algunas características farmacológicas del influjo de calcio dependiente de voltaje, se observó su comportamiento frente a dos bloqueadores de los canales de calcio, el níquel y la nifedipina. Para ello las células fueron incubadas con 50, 200 ó 600  $\mu$ M de  $NiCl_2$  en el medio 1 minuto antes de adicionar la valinomicina para después inducir el flujo de calcio por 60 mM de KCl. Bajo estas condiciones se manifestaron bloqueos parciales con 50 y 200  $\mu$ M ( $64 \pm 16.9$  %  $n=5$ ) y bloqueos casi totales con 600  $\mu$ M ( $83 \pm 14.7$  %  $n=5$ ). El ejemplo de cinco trazos está representado en la figura 13 A. En contraste, el tratamiento con nifedipina no produjo bloqueo de la respuesta

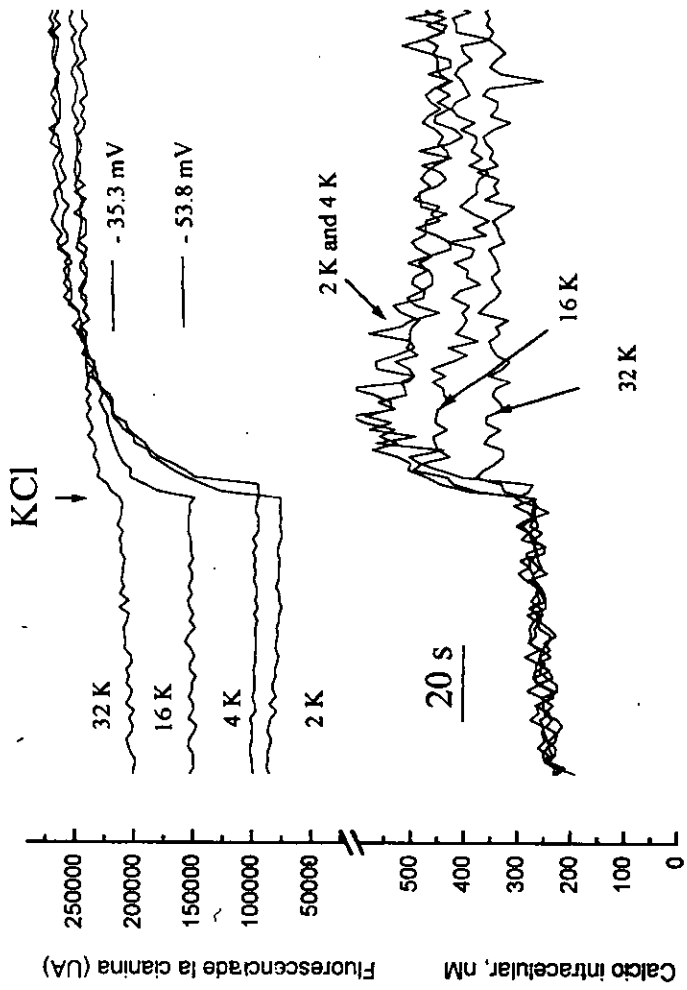


figura 11.- Inactivación dependiente de potenciales de reposo despolarizados.  $E_k$  más negativos dan el incremento máximo de la figura (2 y 4 mM de  $K^+$ ) con la misma intensidad. A partir de  $E_k$  a  $-53.8$  mV (16 mM de  $K^+$ ) comienza a disminuir la respuesta hasta llegar al valor más bajo de calcio (36 %) registrado a  $E_k$  de reposo de  $-35.3$  mV (32 mM de  $K^+$ ). En todos los casos el pulso de voltaje llevó al  $V_m$  a  $-17.2$  mV.

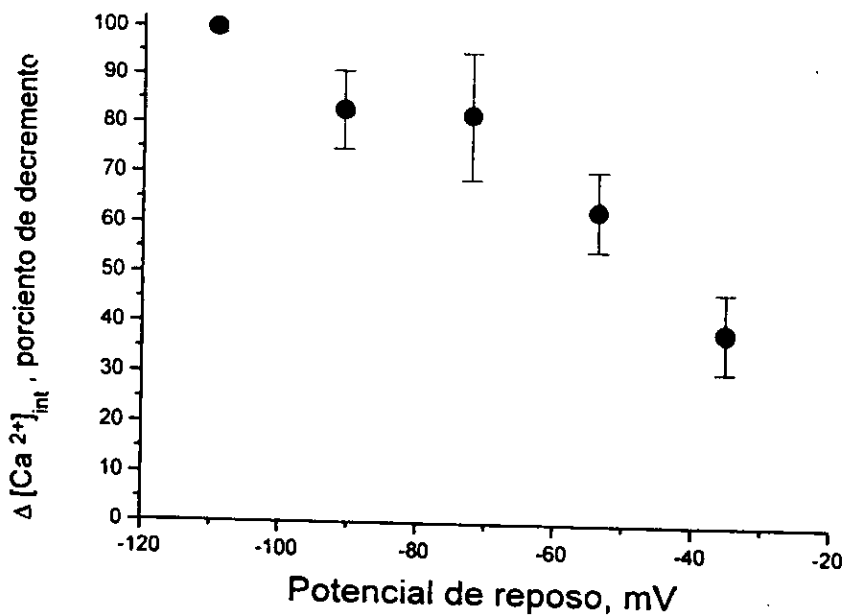


Figura 12.- Dependencia del decremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  al potencial de reposo. En la gráfica se indica la tendencia que sigue la concentración de calcio interno a  $V_m$  despolarizados con pulsos de voltaje a  $-17.2$  mV. El decremento detectado se expresa en porcentaje y el  $E_k$  en el reposo en mV. Los puntos graficados con sus errores estándar corresponden a una  $n=7$ .

de calcio frente al pulso de voltaje aplicado aun cuando la concentración utilizada fue bastante alta ( $50 \mu\text{M}$ ) (Hockberger et al., 1994; Herrington et al., 1992) y la incubación se llevó a cabo en obscuridad cinco minutos antes de iniciar el registro. Dado que la afinidad de los receptores de la membrana plasmática a las dihidropiridinas es afectada tanto por el pH externo como por  $V_m$  de reposo hiperpolarizado (Hille, 1992), además de que en espermatozoide de bovino bajo condiciones de preincubación a pH 6.5 se inhibió, con nifedipina entre otros, el incremento en el calcio intracelular inducido por despolarizaciones a pH 8.5 (Babcock y Pfeifer, 1987); se hicieron aquí otros experimentos aplicando nifedipina a espermatozoides preincubados con HSMm a pH 6.5 (amortiguado con 10 mM de PIPES en lugar de HEPES) y nifedipina  $50 \mu\text{M}$  o a  $V_m$  de reposo de  $-30$  mV. En estos trazos tampoco se detectó descenso en la respuesta del calcio intracelular (figura 13 B y C).

### INACTIVACIÓN

Otra manera de estudiar la inactivación del flujo de calcio dependiente del voltaje fue el someter a los espermatozoides a despolarizaciones con KCl en la celdilla con H-HSMm sin calcio suplementado con 0.5 mM de EGTA (H-HSMm $0\text{Ca}^{2+}$ ), y a diferentes tiempo o voltajes restaurar la concentración externa de calcio. Así fue posible determinar cuanto tiempo permanece abierta la vía de permeabilidad. El valor del  $V_m$  al reposo que se alcanzó ( $-70$  mV) en H-HSMm $0\text{Ca}^{2+}$  fue cercano al  $E_k$  (fijado con valinomicina). Dicho valor de  $V_m$  coincide con una disminución de la concentración basal de calcio intracelular que a diferencia del trazo control no registra ligeros aumentos tras la aplicación de valinomicina (figura 14). Esto indica que en medio con calcio, el aumento ligero de calcio que induce la valinomicina proviene del calcio extracelular.

Posteriormente se obtuvo la fluorescencia del calcio y  $V_m$ , en registro simultáneo, con voltajes fijos a  $-70.4$  mV y pulsos de voltaje a  $-53.7$ ,  $-30.3$  y  $-14.9$  mV con valinomicina 1 minuto antes que KCl en la cuvette de registro con H-HSMm $0\text{Ca}^{2+}$ . La adición de 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  (concentración que corresponde al H-HSM normal) 60 segundos después de la despolarización reflejan el mismo perfil que el de las curvas de dependencia de voltaje (figura 15 A). En otros experimentos hechos también en H-HSMm $0\text{Ca}^{2+}$  la concentración de calcio intracelular estimulada por desopolarización con

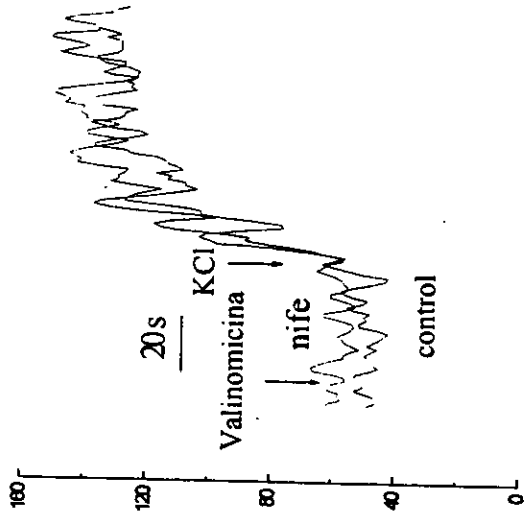
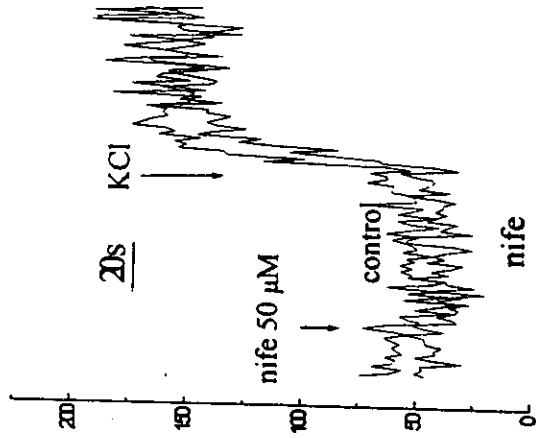
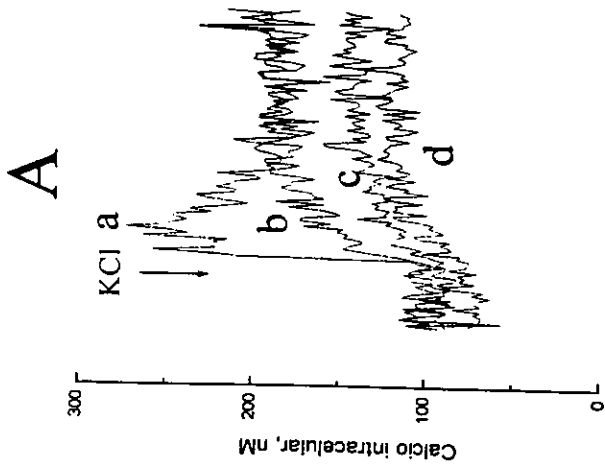




Figura 13.- Efecto de bloqueadores de los canales de calcio dependientes de voltaje. A) Incubación de los espermatozoides con 50 (b), 200 (c) y 600  $\mu\text{M}$  (d) de  $\text{Ni}^{2+}$  en comparación con el control (a). B) Preincubación durante 5 minutos con 50  $\mu\text{M}$  de nifedipina (nife) en la celdilla con espermatozoides a pH 6.5. C) La misma concentración de nifedipina a  $V_m$  de reposo de  $-30$  mV. La incubación con nifedipina se hizo en la misma celdilla de fluorescencia en oscuridad.

KCl (con valinomicina 1 minuto antes) permanece igual después de añadir 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  10 y 60 segundos después del KCl (60 mM) y decae en los siguientes tiempos evaluados (figura 15 B). Este comportamiento admite que la vía de permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  permanece abierta hasta 60 segundos después de haber sido estimulada. Los trazos que se presentan en la figura 15 son representativo de 5 experimentos más. Estos registros muestran que la vía de permeabilidad a calcio se abre conforme el potencial alcanza valores menos negativos con los pulsos de voltaje suministrados, es decir una diferencia de voltaje mayor entre el  $V_m$  de reposo y el pulso aplicado permiten la activación de canales de calcio dependientes de voltaje que permanecen abiertos durante un minuto aun en ausencia de calcio extracelular.

### **EFECTO DEL pH**

Otras posibilidades fueron exploradas incluyendo variables como el  $\text{pH}_i$ . En primer lugar se hicieron registros de  $\text{pH}_i$  y  $V_m$  también en registro simultáneo en el equipo de PTI (ver metodología). Previo a esto, se realizó la calibración del  $\text{pH}_i$  en el fluorómetro y sus resultados se encuentran representados en la figura 4. Aquí se puede ver como la intensidad de la fluorescencia llega a un nivel basal al adicionar los espermatozoides cargados con BCECF-AM a la cuveta con 500 nM de DiSC3(5) y H-HSMm. La radiometría de excitación (ver métodos), se mantiene en un valor constante de fluorescencia (unidades arbitrarias) hasta que se colapsa a las células con 0.05 % de Tritón para promover la liberación del colorante y detectar entonces el  $\text{pH}$  correspondiente al medio (7.6). Las variaciones del  $\text{pH}$  de este medio (con HCl o con NaOH) permitieron conocer, por extrapolación, el  $\text{pH}_i$  de los espermatozoides de humano que en promedio alcanzó un valor de  $6.72 \pm 0.05$  de un total de 5 experimentos.

Una vez calibrado el  $\text{pH}_i$  se investigó el efecto de una despolarización semejante a la que provoca el influjo de calcio con 60 mM de KCl 1 minuto después de agregar  $1\mu\text{M}$  de valinomicina en medición simultánea. Los experimentos se desarrollaron sin mayores dificultades bajo las circunstancias explicadas en la metodología. Este monitoreo mostró que la despolarización además de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje también provoca una ligera alcalinización del medio intracelular de 0.1 unidades de  $\text{pH}$  (figura 16).

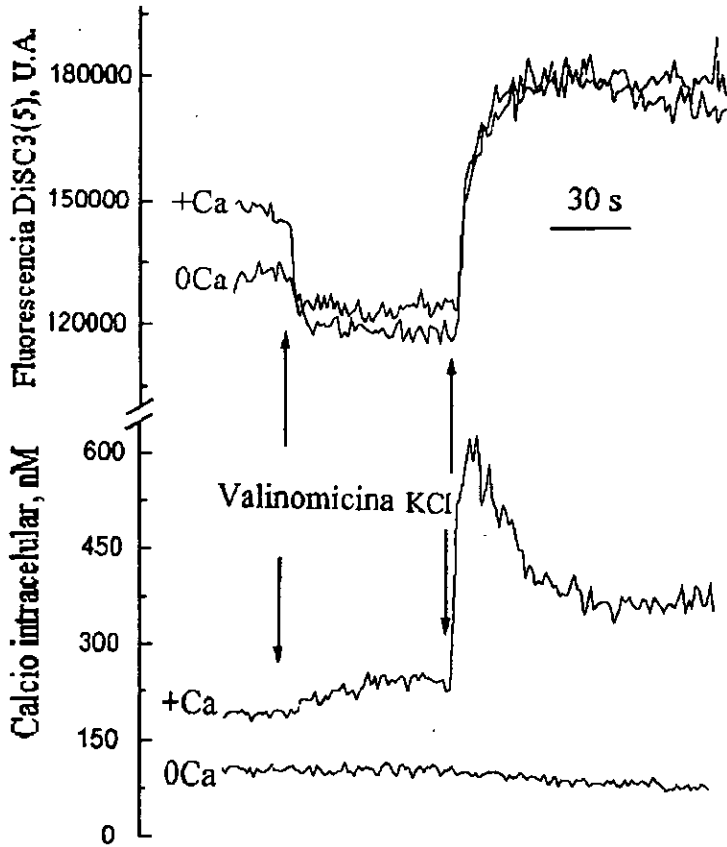
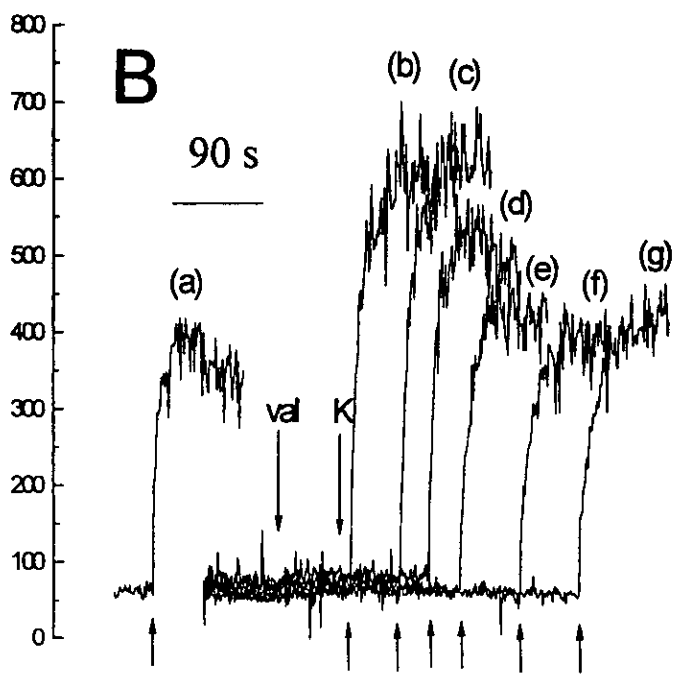
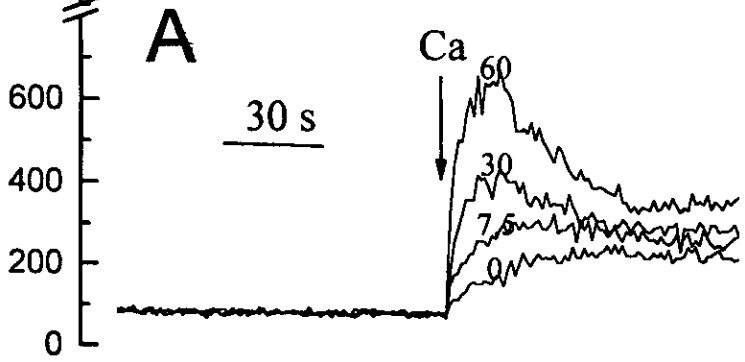
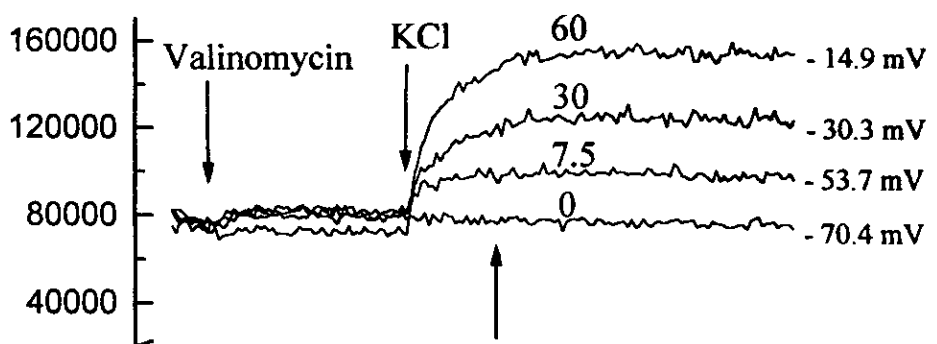


Figura 14.- Efecto de la valinomicina ( $1\mu\text{M}$ ) y la subsecuente adici3n de  $\text{K}^+$  ( $60\text{ mM}$ ) en los registros simult3neos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $V_m$ , en espermatozoides incubados en medio con y sin calcio ( $\text{H-HSMm0Ca}^{2+} + 0.5\text{ mM}$  de EGTA).

Fluorescencia de DiSC<sub>3</sub>(5), A.U.

Calcio intracelular, nM

Calcio intracelular, nM



2.5 mM CaCl<sub>2</sub>

Figura 15.- Efecto de la despolarización en el calcio intracelular de espermatozoides de humano no capacitados incubados en ausencia de calcio. Los registros simultáneos se hicieron en H-HSMm sin calcio + 0.5 mM de EGTA (H-HSMm0Ca<sup>2+</sup>). A) Los diferentes V<sub>m</sub> en mV indicados a cada lado de las curvas (con adiciones de las concentraciones de KCl indicadas un minuto después de la valinomicina 1 μM) (parte superior) y su efecto en la concentración de calcio intracelular adicionando 2.5 mM de calcio un minuto después del KCl (parte inferior). B) Concentración de calcio intracelular que se obtuvo con 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub> añadido 1 minuto después de valinomicina 1 μM en espermatozoides no despolarizados con KCl e incubados en H-HSMm0Ca<sup>2+</sup> (a). Valores de calcio intracelular que se alcanzaron tras la adición de CaCl<sub>2</sub> (60 mM) 10 (b), 60 (c), 90 (d), 120 (e), 180 (f) y 240 (g) segundos después de valinomicina (val) y KCl.

En otros experimentos se indagó el efecto del  $\text{pH}_i$  en el calcio intracelular y el  $V_m$  en registro simultáneo tratando a los espermatozoides con  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  10 mM, 60 mM KCl ó 60 mM KCl+10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ , 1 minuto después de la valinomicina en la celdilla con H-HSMm. Los resultados de este tratamiento revelaron que la alcalinización del medio con  $\text{NH}_4^{2+}$  requiere de una despolarización adjunta para elevar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Esta elevación fue  $92 \pm 41\%$  ( $n=5$ ) mayor que la obtenida solo con 60 mM de KCl. La sola adición de  $\text{NH}_4^{2+}$  produce un mínimo incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El ejemplo de estos experimentos se muestra en la figura 17. Con esto se pudo asumir un papel del  $\text{pH}_i$  al aumentar la concentración del calcio intracelular en el espermatozoide de humano no capacitado.

### **EFFECTO DEL VOLTAJE EN LA RA**

Por último, la RA fue disparada en espermatozoides de humano no capacitados, por una despolarización de la membrana plasmática con  $\text{K}^+$  para determinar un posible papel de los canales de calcio dependientes de voltaje en los procesos de la RA. Aunque estos resultados no brindan datos contundentes acerca de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje en condiciones fisiológicas, si se puede establecer que no es necesario elevar el  $\text{pH}$  extracelular para obtener una diferencia entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado por los diferentes tratamientos. Así tenemos que para aquellos espermatozoides incubados con valinomicina y DMSO (ver método) se detectó un porcentaje de  $53 \pm 4$  y  $43 \pm 1$ , respectivamente, de espermatozoides reaccionados que analizados estadísticamente ( $p < 0.05$ ) no son significativamente diferentes, mientras que los espermatozoides reaccionados por A23187 ( $90.6 \pm 2\%$ ), por valinomicina+KCl ( $77 \pm 11\%$ ) y por KCl ( $68 \pm 12$ ) son significativamente diferentes del control con DMSO. El % de espermatozoides reaccionados fue ligeramente mayor en espermatozoides tratados con valinomicina+KCl. Con éstos resultados se presume que el flujo de calcio estudiado estimuló a la reacción acrosomal en los espermatozoides de humano no capacitados. En la figura 18 se muestra una gráfica con estos resultados.

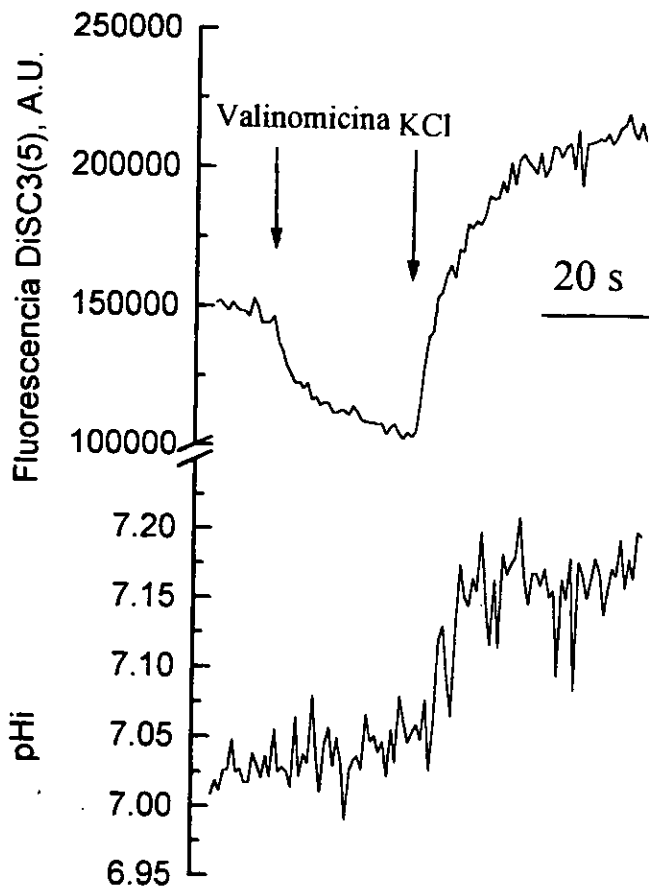


Figura 16.- Efecto de la despolarización de la membrana plasmática sobre el  $pH_i$ . Se representa un ligero incremento en el  $pH_i$  inducido por la despolarización de la membrana plasmática en H-HSMm a  $pH$  7.6.

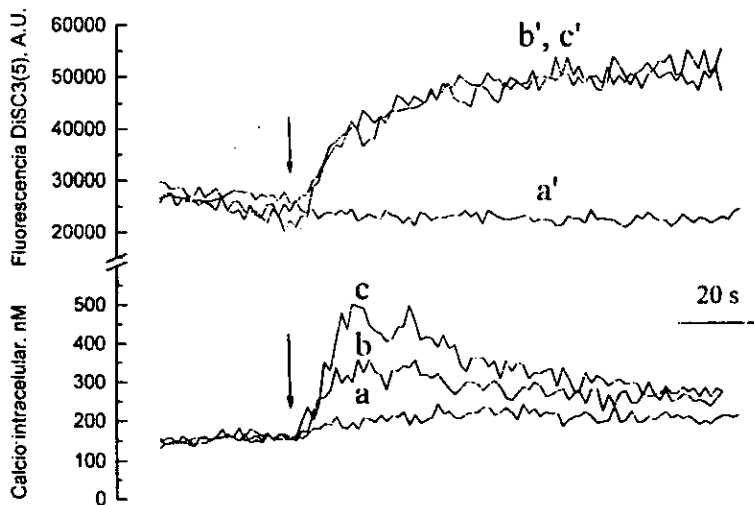


Figura 17.- Comportamiento de las curvas de calcio frente a la alcalinización del medio intracelular en registro simultáneo al de Vm. Aplicación de  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  10 mM (a, a'), de 60 mM de  $\text{K}^+$  (b y b') y de  $\text{NH}_4\text{Cl}_2 + \text{KCl}$  al unísono (c y c') sobre los registros de calcio intracelular y Vm.



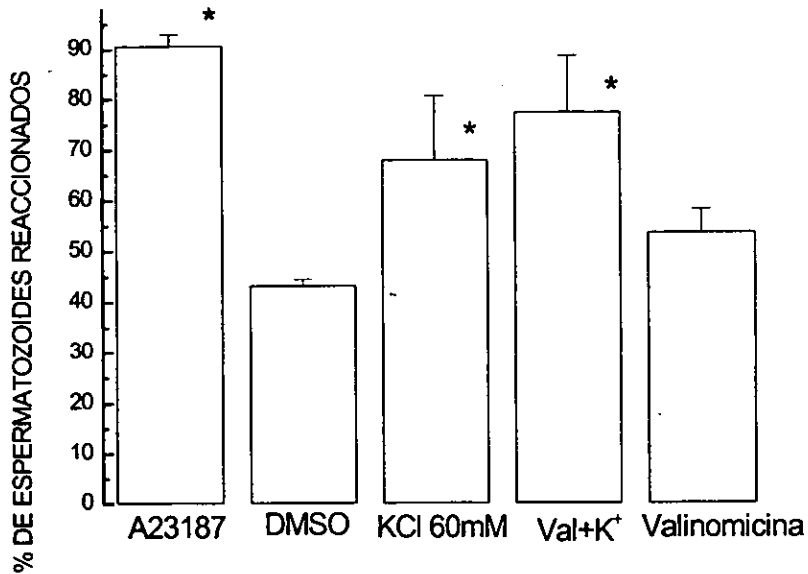


Figura 18.- Papel de los canales de calcio dependientes de voltaje en la RA. Gráfica donde se representa el porcentaje de espermatozoides no capacitados con acrosoma reaccionado cuando fueron sometidos a los diferentes tratamientos especificados en la metodología. Se observa una diferencia \*significativa ( $p < 0.05$ ) entre el control y los tratamientos. Las desviaciones estándar provienen de una n de 3.

## V. DISCUSIÓN

Uno de los aspectos revisados en este trabajo fue el efecto del potencial de membrana sobre el calcio intracelular de los espermatozoides de humano por métodos fluorométricos, ya que su forma y tamaño dificultan su monitoreo por medios electrofisiológicos. Gracias a las adaptaciones que se le hicieron al equipo aquí empleado estos efectos pudieron relacionarse de una manera más directa y rápida que si se hubieran empleado sistemas de medición simples.

Dado que las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión bajo las cuales reacciona el fura-2 son menores (340/380 Ex. y 488 Em.) que las utilizadas para el colorante de potencial de membrana DiSC3(5) (670 Ex. y 600 Em.), los espectros de fluorescencia simultáneos no registraron señal de interferencia cuando el pico de respuesta para cada fluoróforo apareció, lo cual aprueba la posibilidad de utilizarlos al unisono para medir más de 1 evento fisiológico en el mismo sistema. Con esto y bajo las condiciones adecuadas de concentración tanto de espermatozoides como de colorantes (ver resultados), se observó que las señales simultáneas de fluorescencia obedecen a un patrón normal comparable con mediciones individuales (resultado no mostrado). Estas señales simultáneas registraron cambios frente a estímulos como modificaciones del voltaje de la membrana plasmática. Los cambios que corresponden a una hiperpolarización inducida por valinomicina indican que el potencial de reposo de la membrana se mantiene en un valor menos negativo (en condiciones no capacitantes) que el  $E_k$  de los espermatozoides y que esta hiperpolarización promueve un ligero incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . La espiga de calcio impulsada por la despolarización con  $K^+$ , después de la permeabilización de la membrana con valinomicina, alcanza su pico máximo a los 25 segundos y se sostiene ligeramente arriba del nivel basal normal. La correspondencia observada entre la despolarización y la espiga de calcio muestra un flujo de calcio dependiente de voltaje que eleva la concentración de calcio intracelular del espermatozoide de humano. Para determinar el cambio de voltaje en mV al cual se induce el influjo, se calibró el  $V_m$ . De esta calibración, el rango (-70 a -15 mV) que guarda una proporción directa con la fluorescencia marcó los límites bajo los cuales se realizó el trabajo.

Entre las características del flujo de calcio dependiente de voltaje, el incremento gradual de la concentración de calcio intracelular registró su nivel mínimo con despolarizaciones de 9 mV y llegó al punto máximo estudiado con 55 mV a partir de un  $E_k$  de  $-70$  mV. La relación encontrada entre el porcentaje de incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , con respecto a la despolarización revela una dependencia de voltaje del flujo que se activa con ligeras despolarizaciones. La dependencia de voltaje de los canales de calcio se ve afectada por el potencial de membrana en reposo, ya que en los experimentos realizados en condiciones fisiológicas (sin valinomicina) donde el potencial de reposo es en promedio 30 mV menos negativo que el  $E_k$ , pulsos de voltaje que llevan al  $V_m$  a  $-15$  mV inducen una respuesta en la  $[Ca^{2+}]_i$  mucho menor que la observada cuando el potencial de membrana se encuentra a  $-70$  mV ( $E_k$  en condiciones normales de  $K^+$  externo) con un pulso de voltaje de la misma intensidad. Esto hablaría de un posible estado de inactivación de los canales al cual se encuentra la membrana plasmática ( $-40$  mV) y de una característica de los canales, cuya dependencia de voltaje concuerda con lo reportado para espermatozoides de ratón, donde corrientes de calcio a través de un canal de calcio dependiente de voltaje tipo T muestra un umbral de activación desde  $-60$  mV en adelante con un pico máximo a  $-20$  mV a partir de un potencial de membrana de  $-80$  mV (Arnoult et al., 1996a; Liévano et al., 1996).

En concordancia con lo anterior, los experimentos de inactivación de canales de calcio muestran una tendencia a disminuir la concentración en el incremento del calcio intracelular conforme el potencial de reposo alcanza valores más positivos (figura 12). Así tenemos que, potenciales de reposo de  $-70$  mV y más negativos registran las máximas respuestas de calcio mientras que a valores de  $-53$  y  $-35$  mV la respuesta de calcio cae hasta un 35 % en el último punto registrado comparable con el 27 % de incremento reportado para valores de potencial de membrana de  $-40$  mV en el reposo. Con esto podría inferirse que los canales de calcio efectivamente se encuentran en un estado de inactivación que es removido por potenciales de membrana menores al del reposo bajo condiciones no capacitantes.

Otra característica del flujo es que sólo concentraciones de  $600 \mu M$  del bloqueador  $Ni^{2+}$  inhiben casi la totalidad de la respuesta de calcio mientras que con  $50 \mu M$  se da una

respuesta 50 % menor con respecto al control. Este bloqueador se ha reportado como selectivo de canales de calcio tipo T (Hille, 1992) que, además, a concentraciones de 50  $\mu$ M, inhibe la reacción acrosomal inducida por ZP3 en espermatozoides de mamífero y la corriente de calcio en los espermatozoides (Arnoult et al., 1996a; Liévano et al., 1996). Sin embargo, el bloqueo de los mismos canales tipo T por antagonistas de los canales de calcio tipo L como nifedipina (Liévano et al., 1996) no se presentó en los espermatozoides de humano (ver figura 13) lo cual indica que el flujo de calcio dependiente del voltaje descrito en esta tesis no corresponde al canal de calcio tipo T descrito en espermatozoides de ratón. En concordancia con esto, cabe destacar que, contrario a lo especificado para los canales de calcio tipo T en los que la inactivación aparece en milisegundos (5-10) en experimentos de electrofisiología (Bean, 1989; Hille, 1992), no parece haber inactivación del flujo de calcio dependiente de voltaje, pues, como se observó a despolarizaciones de -30 y -15 mV, inmediatamente después del pulso de voltaje, el incremento de calcio permanece durante segundos. Además, en los experimentos en los que se restableció el calcio del medio después de una despolarización, a los mismos valores que los de los experimentos de dependencia de voltaje, el perfil fue similar, es decir, con el voltaje fijo (-70.4 mV), la aplicación de un voltaje a -53.7 mV activa al sistema de calcio paulatinamente hasta -15 mV y permanece abierta durante 1 minuto aun en ausencia de calcio, cabe señalar que a -70.4 mV la sola adición de calcio incrementa la concentración de calcio intracelular de 100 a 150 nM; este fenómeno se debe a una captación basal de calcio debido a los mecanismos de transporte encargados de mantener una homeostasis de calcio en el reposo.

La determinación de la inactivación con respecto al tiempo presentó dificultades con el método de la figura 15 A en este estudio. En primer lugar la determinación de la inactivación de los canales se hace por medio del análisis de las corrientes después de la aplicación de un pulso de voltaje, por corriente eléctrica, que no interrumpe el registro, mientras que en esta metodología solo se analizan incrementos en concentraciones del calcio intracelular donde determinar la existencia de un paso del orden de milisegundos requiere de mayor destreza. La razón es que el tiempo desde que se adicionan los reactivos, momento en el cual se detiene el sistema de medición, hasta que se le da

seguimiento al registro pasan de 3-5 segundos tiempo al cual la inactivación de los canales tipo T ha concluido dejando oculta una cinética de incremento, previa a la registrada (si existiera), que correspondería a una elevación transitoria dependiente de calcio. Sin embargo, en la figura 15 B, el decaimiento en el calcio intracelular que comienza después de 60 segundos y finaliza a los 2 minutos sugiere que estos presuntos canales de calcio dependientes de voltaje tiene una lenta inactivación. Al respecto, Hockberger y Nam (1994) han reportado, en neuronas en desarrollo, una inactivación lenta de los canales de calcio activados por voltajes altos cuya corriente también es insensible a nifedipina. Otra posibilidad sería la existencia de dos tipos de permeabilidad al calcio cuyas respuestas se encuentren sobrelapadas y relacionadas directa o indirectamente.

En discrepancia con lo anterior, la existencia de canales de calcio dependientes de voltaje tipo T en espermatozoides de ratón ha sido el único tipo de canal funcional reportado en células de este tipo cuyas características son: se inactiva en milisegundos, responde a la aplicación de voltajes bajos y es bloqueado por nifedipina y  $Ni^{2+}$ . Estas diferencias son un ejemplo de la diversidad que podría encontrarse de tipo de célula a tipo de célula o de especie a especie.

En otro contexto, el efecto bloqueante de la RA por nifedipina ha propiciado que se le atribuya un papel en el desarrollo de esterilidad, pues se ha informado que hombres con ese tipo de problema han sido tratados con fármacos que incluyen esa sustancia (Benoff, 1994). En este trabajo se pone en duda este razonamiento puesto que en los experimentos aquí realizados no se observa un verdadero efecto bloqueante de la nifedipina; asimismo, hay que tomar en cuenta que los espermatozoides todavía tienen que sufrir cambios en el paso de espermatozoides a espermatozoides, en el proceso de maduración y en el de capacitación. Además, como no está especificado este papel, la posibilidad de que la nifedipina tenga o no efectos directos anticonceptivos a través de los canales de calcio queda incierta. Es importante resaltar que aun cuando la nifedipina no bloquea el flujo de calcio dependiente del voltaje descrito en este trabajo, existen reportes de que este bloqueador inhibe la RA inducida por  $K^+$  en condiciones alcalinas en el espermatozoide humano. Hershlag et al. (1995), han encontrado que la nifedipina

altera la composición de la membrana plasmática de manera que ligandos a manosa, importantes para la RA, disminuyen su exposición. Esto podría explicar porque la nifedipina inhibe la RA por una vía que no involucra canales de calcio dependientes del voltaje.

Previas investigaciones han propuesto la existencia de un influjo de calcio no dependiente de voltaje que podría contribuir con las señales de transducción durante la RA. En este estudio se determinó una elevación de la concentración de calcio intracelular potenciada por una alcalinización del medio intracelular sólo en presencia de una despolarización de la membrana plasmática (figura 17). Observaciones similares se han dado en espermatozoides de erizo de mar donde la alcalinización del pH intracelular con  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  dispara una permeabilidad en el calcio intracelular y puede ser activada por la capa gelatinosa que recubre a los ovocitos del erizo (García-Soto, et al., 1987). La misma condición de incremento del calcio intracelular ha sido reportada antes por Babcock et al. (1987) para espermatozoides de camero y por Branadelli et al. (1996) en la inducción de la RA en espermatozoide humano. El efecto potenciador que ejerce la alcalinización del medio intracelular determinado por despolarización podría deberse a una estimulación de los mismos canales de calcio, aquí detectados, aunque no se excluye la posibilidad de que se active otra vía de permeabilidad a calcio independiente de estos canales de calcio dependientes de voltaje que, tal vez, forme parte de la cascada de eventos en la exocitosis del acrosoma. Desafortunadamente, el acople entre la despolarización y el incremento del  $\text{pH}_i$  no se ha esclarecido a pesar de que se han identificado mecanismos de regulación del  $\text{pH}_i$  dependientes de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  durante la capacitación que pudrían jugar un papel activo (Zeng, et al., 1996). Igualmente, en base a experimentos hechos con microscopía de epifluorescencia e indicadores de  $\text{pH}$  y calcio, se tienen indicios de la existencia de un eflujo de protones durante la RA en el espermatozoide de ratón inducida por la ZP3 (Lee y Storey, 1989; Storey et al., 1992). Con fundamento en nuestros experimentos, en los que se detectó una elevación del  $\text{pH}_i$  como resultado de la despolarización de la membrana plasmática, podríamos decir que al menos una parte de ese eflujo podría deberse a la despolarización de la membrana plasmática provocada por la ZP3 al espermatozoide de mamífero.

A diferencia de lo reportado por Brandelli et al. (1996) en el espermatozoide humano, en que la RA inducida por  $K^+$  requiere una elevación del pH externo, en nuestros resultados no se requirió elevar el pH externo ya que 60 mM de KCl por si mismo produjo una alta reacción acrosomal que fue mayor cuando se hiperpolarizó previamente con valinomicina. La disparidad entre estos resultados y los reportados pudiera explicarse con el hecho de que a diferencia de nuestros experimentos, en los publicados el potasio se elevó manteniendo la fuerza iónica constante. En nuestras condiciones, hemos observado una tendencia a la hiperpolarización en espermatozoides capacitados que, de acuerdo a las propiedades del flujo de calcio dependiente del voltaje descrito en esta tesis, removería la inactivación de modo que una despolarización debería abrir más canales y elevar la concentración de calcio con una consecuente mayor RA. La valinomicina favorecería aun más este proceso, como lo sugiere el ligero incremento en la RA cuando este ionóforo se pone antes que el potasio. En los experimentos hechos por Brandelli (1996) se despolarizó con potasio reemplazado por sodio para mantener la fuerza iónica constante. Quizá la baja en la concentración de sodio podría alterar cierto proceso que de algún modo impidiera la hiperpolarización y que, de algún otro modo, a su vez se revirtiera con la elevación del pH externo. Estas posibilidades deben investigarse.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **VI.CONCLUSIONES**

Los registros simultáneos de calcio y potencial de membrana con los colorantes utilizados y con las adaptaciones metodológicas especificadas son factibles. Por ello se pueden proponer como una alternativa para el estudio de las propiedades de transporte iónico de las células en suspensión como los espermatozoides cuya forma y tamaño limitan su estudio por métodos electrofisiológicos.

En este trabajo se investigó la existencia de canales de calcio en el espermatozoide de humano no capacitado por métodos fluorométricos. Este sistema de influjo de calcio dependiente de voltaje reúne las siguientes características: 1) activación en un rango de voltajes (rango estudiado) de  $-60.7$  a  $-15$  mV que permanece durante 1 minuto, 2) inactivación por voltaje, 3) bloqueo por níquel pero no por nifedipina, 4) estimulación por una alcalinización del pH intracelular.

Estas características no corresponden a los canales de calcio tipo T, L o N/P, por lo que probablemente el influjo de calcio se deba a un nuevo tipo de canal de calcio no descrito hasta ahora en la literatura.

La RA es ligeramente mayor en los espermatozoides de humano no capacitados que se estimularon por un pulso de voltaje después de una hiperpolarización. De este trabajo de tesis se desprende la necesidad de estudiar la relevancia fisiológica de este sistema de transporte de calcio, tanto durante la capacitación como en los mecanismos de disparo de la RA con progesterona o la ZP.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. R. (1989) *Molecular Biology of the Cell*. 2a edición. Ed. Garland Publishing, Inc. New York.
2. Arnoult, C., Cardullo, R. A. (1996a) "Activation of mouse sperm T-type  $Ca^{2+}$  channel by adhesion to the egg zona pellucida" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13004-9.
3. Arnoult, C., Zeng, Y. y Florman, H. M. (1996b) "Zp3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization" *J. Cell Biol.* 134, 637-45.
4. Babcock, D. F. (1983) "Examination of the intracellular ionic environment and the ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore" *J. Biol. Chem.* 258, 6380-89.
5. Babcock, D. F. y Pfeiffer, D. R. (1987) "Independent elevation of cytosolic  $[Ca^{2+}]$  and pH-sensitive mechanisms" *The Journal of Biological Chemistry*. 262, 15041-47.
6. Bean, B.P. (1989) "Classes of calcium channels in vertebrate cells" *Annu. Rev. Physiol.* 51, 367-84.
7. Benoff, S., Cooper, G. W., Hurley, Y., Mandel, F. S., Rosenfeld, D. L., Scholl, G. M., Gilbert, B. R. y Hershalg, A. (1994) "The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential" *Fertil. Steril.* 62, 606-17.
8. Bentley, J. K., Garbers, D. L., Demino, S. E., Noland, T. D. y Van Dop, C. (1986) "Spermatozoa contain a guanine nucleotide-binding protein ADP-ribosylated by pertussis toxin" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138, 728-34.
9. Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R. y Alexander, N. (1990) "Progesterone and 17  $\alpha$ -hydroxiprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm" *J. Biol. Chem.* 265, 1376-80.
10. Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1983) "Sperm egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein" *Dev. Biol.* 95, 317-24.

- 11.Brandelli, A., Miranda, P. V. Y Tezón, J.G. ( 1996 ) "voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosome exocytosis induced by N-acetyl glucosaminy/manosyl neoglicoproteins" *J. Androl.* 17, 522-9.
- 12.Carlson, B. M. (1994) *Human Embriology and Developmental Biology* . Ed.Mosby U.S.A.
- 13.Dale, B., De Felice, J. L. y Taglietti, V. (1978) "Membrane noise and conductance increse during single spermatozoa-egg interaction" *Nature* 275, 217-19.
- 14.Domino, S. E. y Garbers, D.L. (1988) "The fucosa-sulfate glycoconjugate that induces an acrosome reaction in spermatozoa stimulates inositol 1, 4, 5-trisphosphate acumulation" *J. Biol. Chem.* 263, 690-95.
- 15.Eddy, E. M. y O'Brien, D. A. (1994) *The physiology of Reproduction : The Spermatozo.* (Eds.Knobil E. Y Neill). 2a edición, Ed. Raven Press Ltd. New York.
- 16.Florman, H. M., Corron, M. E. Kim, T. D-H. Y Babcock, D.F. (1992) "activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis" *Dev. Biol.* 152, 304-14.
- 17.Florman,H.M. y Wassaarman, P.M. (1985) "O-linked oligosacarides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity" *Cell.* 41, 313-24.
- 18.Florman, H. M., Tombes, R.M., First, N.L. y Babcock, D. F. (1989) "An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca<sup>2+</sup> and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis" *Dev. Biol.* 135, 133-46.
- 19.Foresta, C., Rossato, M. Y Di Virgilio, F. (1993) "Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrne" *Biochem. J.* 294, 279-83.
- 20.Garcia-Soto, J., González-Martínez, M., De La Torre, L. Y Darzon, A. (1987) "Internal pH can regulate Ca<sup>2+</sup> uptake and the acrosome reaction in Sea urchin sperm" *Dev. Biol.* 120, 112-20.
- 21.Grynkievicz, G., Poenie, M. Y Tsien, R.Y. (1985) "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties" *J. Biol. Chem.* 260, 3440-50.
- 22.Herrington J., Lingle C.J. (1992) "kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in rat clonal (GH3) pituitary cells" *J. Neurophysiol.* 68, 213-31.

23. Hershlag, A., Cooper, G.W. y Benoff, S. (1995) "pregnancy following discontinuation of a calcium channel blocker in the male partner" *Hum. Reprod.* 10, 599-606.
24. Hille, B. (1992) *Ionic Channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
25. Hockberger E.P. y Nam S. C. (1994) "High-voltage-activated calcium current in developeping neurons is insensitive to nifedipine" *Pflügers Arch.* 426, 402-11.
26. Kopf, G.S., Woolkalis, M. L. Y Gerton, G. L. (1986) "Evidence for guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm" *J. Biol. Chem.* 261, 7327-31.
27. Lee H. C. y Garbers, D. L. (1986) "Modulation of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in Sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract" *J. Biol. Chem.* 261, 16026-32.
28. Lee, M. A. y Storey, B. T. (1989) "End-point of the first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> permeability: population and single cell kinetics" *Gamet. Res.* 24, 303-26.
29. Leyton, L. y Sailing, P. (1989) "95 kd sperm bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding" *Cell.* 57, 1123-30.
30. Liévano, A., Santi, M. C., Serrano, J. C., Treviño, L. C., Belvé, R. A., Hernández, C. A. Y Darzon, A. (1996) "T-type Ca<sup>2+</sup> channels and  $\alpha$ -1e expresion in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction" *FEBS Letters.* 388, 150-4.
31. Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J. y Tesarik, J. (1992) "Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativum agglutinin" *J. Reprod. Fert.* 95, 755-63.
32. Monroy, A. (1969) *Química y Fisiología de la fertilización*. El Manual Moderno, México.
33. Noland, T.D., Garbers D.L. y Kopf, G.S. (1989) *Biol. Reprod.* 38, 94a
34. Organización Mundial de la Salud (1987) *OMS Manual de Laboratorio para el examen de semen humano e interacción moco cervical -semen*. 2 ed. Ed. Panamericana.
35. Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D. Y Meizel, S. (1989) "Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160, 828-33.

36. Roldán, E.R., Murasi, T. y Shi Q.-X. (1994) "Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida" *Science*. 266, 1578-81.
37. Schackman, R. W. y Chock P. B. (1986) "Alteration of intracellular  $Ca^{2+}$  in Sea urchin sperm by the egg peptide speract. evidence that increased intracellular  $Ca^{2+}$  is coupled to  $Na^{+}$  entry and increased intracellular pH" *J. Biol. Chem.* 261, 8719-28.
38. Suarez, S.S., Wolf, D.P., y Meizel, S. (1986) "Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid" *Gamete Res.* 14, 107-21.
39. Tesarik J., Mendoza C., y Carreras A. (1993) "fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction" *Fertil. Steril.* 59, 424-30.
40. Thomas, P. y Meizel, S. (1989) "Phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid of progesterone is dependent upon  $Ca^{2+}$  influx" *Biochem. J.* 264, 539-46.
41. Wassarman, P. M. (1988) "Zona pellucida glycoproteins" *Ann. Rev. Biochem.* 57, 415-42.
42. Wassarman, P. M., y Mortillo, S. (1991) "Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida" *Int. Rev. Cytol.* 130, 85-110.
43. Yanagimachi, R. (1994) *The physiology of Reproduction : Mamalian Fertilization.* (Eds. Knobil E. Y Neill). 2a ed. Ed. Raven Press Ltd. New York.
44. Zeng, Y., Clark, E.N. y Florman, H. M. (1995) "Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion" *Dev. Biol.* 171, 554-63.
45. Zeng, Y., Oberdorf, J.A. y Florman, H. M. (1996) "pH regulation in mouse sperm: identification of  $Na^{+}$ ,  $Cl^{-}$ , and  $HCO_3^{-}$  dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation" *Dev. Biol.* 173, 510-20.