



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**

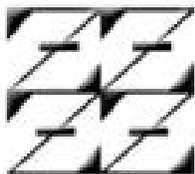
*" DETECCIÓN Y CALIBRACIÓN DEL CONTENIDO DE  
SODIO INTRACELULAR POR FLUORESCENCIA DE  
ISOFTALATO DE BENZOFURANO (SBFI) EN EL  
ESPERMATOZOIDE HUMANO "*

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**GARCÍA SÁNCHEZ NORMA LETICIA**



**DIRECTOR:** DR. MARCO TULIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ  
**ASESORA:** DRA. CONSUELO RUBIO PÓO

ELABORADA EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA,  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM





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.

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a  
Aquel que me dio una razón de vivir,  
por darme la oportunidad de  
conocerle: a ti JESÚS, mi Amado  
Padre, tu quien cambiaste el rumbo de  
toda mi vida.

A mis padres (Roberto y Dionicia)  
quienes me animaron y apoyaron a  
terminar una carrera. Porque siempre  
pusieron su confianza en mi para  
lograrlo.

A mi Director Dr. Marco Tulio por  
brindarme la confianza de realizar mi  
proyecto de Tesis, y por tenerme la  
paciencia para enseñarme y dirigir  
este proyecto.

Gracias

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>TEMA</b>	<b>PÁG.</b>
<b>1. ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b>	<b>7</b>
<b>4.1 Función del aparato reproductor masculino</b>	<b>7</b>
<b>4.2 Estructura y función del espermatozoide</b>	<b>10</b>
<b>4.3 Función celular del sodio</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Papel del calcio en la función del         espermatozoide humano</b>	<b>15</b>
<b>4.5 Regulación de la concentración de calcio intracelular         en el reposo en el espermatozoide</b>	<b>17</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
<b>5.1 Despolarización dependiente de sodio por remoción         de calcio externo en el espermatozoide. Papel del         contenido de sodio intracelular en el proceso</b>	<b>22</b>

<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>8. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>8.1 Población de estudio</b>	<b>26</b>
<b>8.2 Criterios de:</b>	
<b>8.2.1 Inclusión</b>	<b>26</b>
<b>8.2.2 Exclusión</b>	<b>27</b>
<b>8.3 Variables</b>	<b>27</b>
<b>8.4 Material</b>	<b>28</b>
<b>9. METODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
<b>9.1 Composición de los medios y reactivos</b>	<b>30</b>
<b>9.2 Obtención de muestras</b>	<b>30</b>
<b>9.3 Purificación de espermatozoides</b>	<b>33</b>
<b>9.4 Carga de los espermatozoides con el detector óptico         de sodio SBF1</b>	<b>33</b>
<b>9.5 Medición de la fluorescencia en el espermatozoide</b>	<b>36</b>
<b>9.6 Calibración de la señal de sodio</b>	<b>36</b>
<b>9.7 Obtención de <math>\beta</math>, <math>K_d</math>, <math>R_{min}</math> y <math>R_{max}</math></b>	<b>43</b>
<b>9.8 Diseño estadístico</b>	<b>46</b>

<b>10. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>10.1 Calibración de la señal de sodio. Obtención de <math>\beta</math>, <math>K_d</math>,         <math>R_{\min}</math> y <math>R_{\max}</math></b>	<b>50</b>
<b>10.2 Análisis de la gráfica de Lineweaver-Burk</b>	<b>52</b>
<b>10.4 Efecto de la remoción de calcio externo en el contenido         de sodio intracelular en el espermatozoide</b>	<b>53</b>
<b>11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>11.1 Calibración de la señal de sodio. Obtención de <math>\beta</math>, <math>K_d</math>,         <math>R_{\min}</math> y <math>R_{\max}</math></b>	<b>57</b>
<b>11.2 Análisis de la gráfica de Lineweaver-Burk</b>	
<b>11.3 Contenido de sodio intracelular en el reposo en el         espermatozoide</b>	<b>59</b>
<b>11.4 Efecto de la remoción de calcio externo en el contenido         de sodio intracelular en el espermatozoide</b>	<b>60</b>
<b>12. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>13. PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>

## 1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleíco

AMPc: Trifosfato de adenosina cíclico

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio

DiSC3(5): Yoduro de 3,3'-diipropiltiocarbocianina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGTA: Etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acetato

f<sub>380f</sub>: Fluorescencia excitada a 380 libre de sodio

f<sub>380b</sub>: Fluorescencia excitada a 380 unida a sodio

f<sub>340f</sub>: Fluorescencia excitada a 340 libre de sodio

f<sub>340b</sub>: Fluorescencia excitada a 340 unida a sodio

HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperizina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)

H-HSM: Medio de Hepes para espermatozoide humano

Hz: Hertz

MI-HSM: Medio intracelular para espermatozoide humano

n: Número de experimentos

KCl: Cloruro de potasio

K<sub>d</sub>: Constante de disociación

Mg<sub>2</sub>Cl: Cloruro de magnesio

mm: Milímetros

mM: Milimolar

ml: Mililitros

μl: Microlitros

μm: Micrómetros

μM: Micromolar

mV: Milivolts

NaCl: Cloruro de sodio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato ácido de sodio

Na<sub>i</sub>: Sodio intracelular

nM: Nanomolar

nm: nanómetros

NaOH: Hidróxido de sodio

PTI: Photon Technology International

Percoll: Sílica recubierta de polivinilpirrolidona coloidal

RA: Reacción acrosomal

rmp: Revoluciones por minuto

SBFI-AM: Acetoximetil éster de isoftalato de benzofurano

SBFI-Na: Isoftalato de benzofurano unido a sodio

SOC: Canales de calcio operados por vaciamiento de posas internas

TRIZMA: Tris(hidroximetil)aminometano

ZP3: Glicoproteína de la zona pelúcida 3

## 2. RESUMEN

En el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM se llevó a cabo el estudio de la detección y calibración del contenido de sodio intracelular en el espermatozoide humano utilizando la técnica de fluorescencia, durante el periodo comprendido entre Febrero del 2005 a Septiembre del 2005. La determinación de la concentración de sodio intracelular es importante ya que este catión desempeña un papel determinante en la función celular. En este sentido, se ha observado que el espermatozoide presenta una despolarización dependiente de sodio cuando se quita el calcio del medio externo, fenómeno que puede indicar la presencia de canales de calcio que permiten el paso de sodio. En el presente estudio investigamos, en muestras de espermatozoides de seis donadores sanos de 20 a 35 años de edad, si la despolarización dependiente de sodio se acompaña de incremento en el sodio interno. Para ello, se montó una técnica para medir el sodio intracelular con un indicador fluorescente. La concentración de sodio intracelular se ha detectado con el indicador fluorescente SBFI tanto en espermatozoides de humano como en espermatozoides de erizo de mar. En esos estudios se han hecho curvas de calibración sin considerar el valor de la  $K_d$  del SBFI por el sodio ni estimar el rango de saturación. Este procedimiento sesga en cierta medida los valores del contenido de sodio detectados con SBFI. En la presente tesis, hemos deducido ecuaciones y gráficas (tipo Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk y Hanes) que nos permiten además de detectar el

sodio intracelular en el espermatozoide humano, calibrar con mayor exactitud la señal de SBFI obtenida en espermatozoides humanos. Con este análisis encontramos una constante de disociación de SBFI para el sodio intracelular de  $15.29 \pm 2.87$  mM (n=4,  $\pm$  error estándar), que es un valor cercano a el obtenido con otros sistemas. El valor de sodio intracelular en el reposo en el “medio intracelular” (medio preparado con alto contenido de potasio y bajo de sodio y sin calcio, parecido al medio intracelular) estuvo muy cerca del límite de detección de SBFI por lo que estimamos que fue  $< 1$  mM, y se mantuvo así en el rango de 0.55 a 100.55 mM de sodio, indicando una baja permeabilidad a sodio en esta condición. En medio normal (medio externo con alto contenido de sodio, bajo de potasio y calcio en el rango milimolar), la concentración obtenida de sodio intracelular en el reposo fue  $6.57 \pm 0.77$  mM (n=4,  $\pm$  error estándar). En medio normal la disminución abrupta de calcio extracelular con EGTA, de 2.5 mM a 129 nM, produjo una lenta entrada de sodio que alcanzó valores de  $16.97 \pm 5.4$  mM (n=4,  $\pm$  error estándar) en dos minutos. La reposición de calcio al medio externo detuvo el incremento y produjo una muy lenta recuperación sin llegar a los niveles de reposo. En medio con bajo sodio la remoción de calcio con EGTA no produjo influjo de sodio. Estos resultados indicaron que la despolarización dependiente de sodio producida por remoción del calcio externo se acompaña de un incremento en el sodio intracelular en el espermatozoide humano y explicaría porque se activa una bomba sodio/potasio cuando se repone el calcio al medio.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Un evento fundamental en la perpetuación y evolución de las especies es la reproducción sexual, acontecimiento que permite el intercambio de información genética entre los organismos, dándoles una mayor adaptación a su medio y una disminución en la probabilidad de acumular mutaciones genéticas nocivas. La mayor parte de los organismos se reproducen sexualmente a través de la fusión de los gametos provenientes del macho y de la hembra, el espermatozoide y el óvulo respectivamente. Los gametos se generan por meiosis, un proceso de división celular que va acompañado de una reducción a la mitad de la cantidad del material genético de una célula diploide dando lugar a cuatro células haploides. Éste proceso se llama ovogénesis en el caso del femenino y espermatogénesis en el masculino.

Los espermatozoides presentan una forma hidrodinámica característica, que consiste en tres piezas: cabeza, cuello y flagelo, y que le permiten desplazarse por el tracto genital de la hembra hasta llegar a las trompas de Falopio, donde se encuentra con el óvulo. Antes de llevar a cabo la fecundación se orquestan fenómenos que inician, por un lado, con la liberación del óvulo y su viaje a través del oviducto y por otro lado con el viaje que emprende el espermatozoide eyaculado hasta alcanzar a su destinatario. Los espermatozoides presentan cambios bioquímicos y de permeabilidad iónica que modulan el contenido de calcio intracelular y que son fundamentales para que el espermatozoide pueda

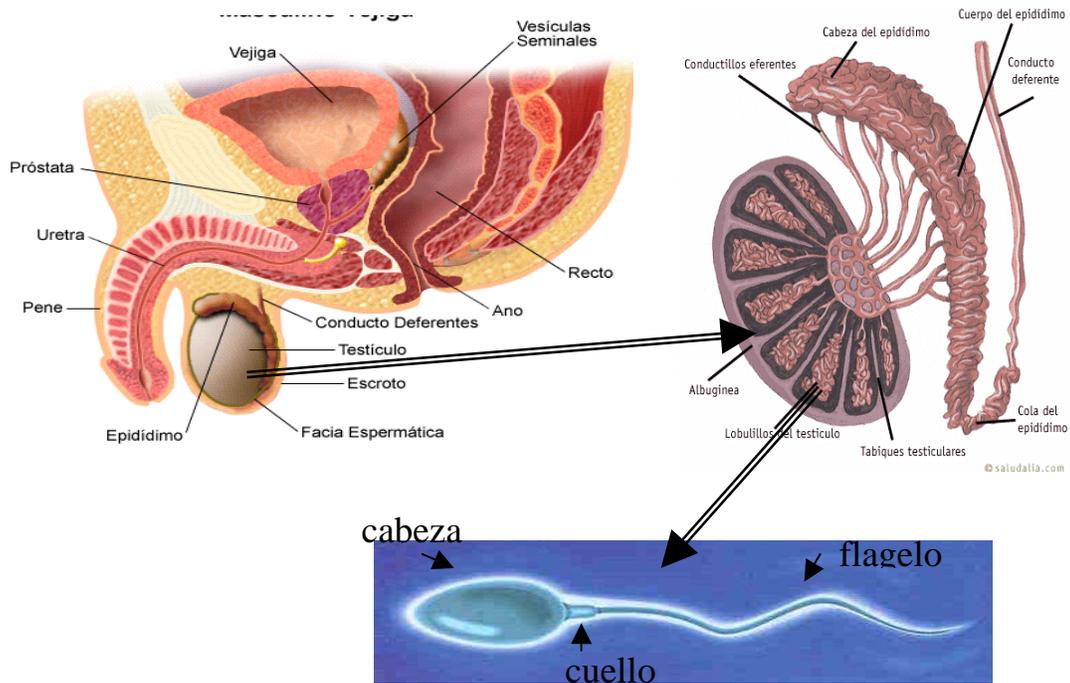
fecundar. Entre las funciones del espermatozoide moduladas por el calcio destacan la movilidad flagelar, la capacitación y la reacción acrosomal.

En la presente tesis se plantea examinar algunas propiedades de transporte iónico que traen como resultado cambios en el contenido de sodio intracelular en el espermatozoide humano, y para ello se establece un método fluorométrico que permite detectar y cuantificar el sodio en dicha célula. Este planteamiento parte de una observación de la existencia de un canal iónico de calcio no dependiente de voltaje, el cual es posible que contribuya de manera significativamente, como un mecanismo de entrada, al establecimiento del calcio intracelular en el reposo en el espermatozoide humano, y que tiene que ver con la regulación de la entrada y salida de iones tanto de sodio como de calcio. Más adelante se indica porque se considera importante el medir el sodio intracelular y como este estudio tiene que ver con la regulación del calcio intracelular del espermatozoide.

## **4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **4.1 Función del aparato reproductor masculino**

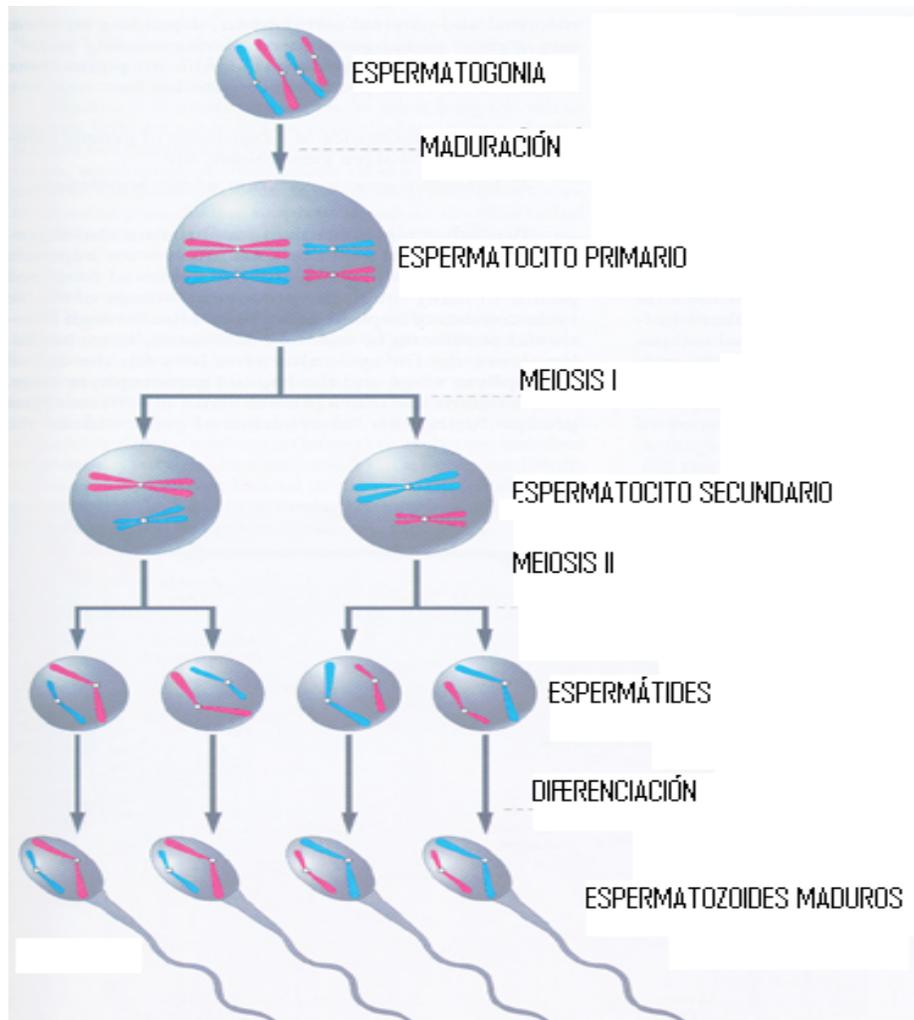
El aparato reproductor masculino es un grupo de órganos que intervienen en la formación, conducción y expulsión de los gametos masculinos (espermatozoides), participando de ésta manera en el proceso de reproducción. Desde el momento en que el varón llega a la pubertad, el organismo produce espermatozoides a partir de las células madre que se encuentran en los túbulos seminíferos de los testículos, estos se almacenan y maduran en el epidídimo, saliendo de los testículos por los conductos deferentes. Durante su camino hacia la uretra los espermatozoides recorren el conducto deferente y se mezclan con el contenido de las vesículas seminales, de la próstata y de las Glándulas de Cowper, formando así el semen. Estas glándulas segregan sustancias que nutren y estimulan el movimiento de los espermatozoides (1,2,3).



**Figura 1.** Estructura del aparato reproductor masculino. FUENTE: Fox S. Fisiología Humana.

La espermatogénesis, comienza cuando las células germinales de los túbulos seminíferos se multiplican, formándose las llamadas espermatogonias, estas aumentan de tamaño y se transforman en espermatocitos primarios, produciéndose la primera meiosis, que da lugar a dos espermatocitos secundarios, y éstos, tras otra división celular, producen dos espermátidas cada uno. Las cuatro células resultantes son haploides, estas espermátidas se convierten en espermatozoides. Para ello, se reduce el citoplasma, el núcleo se alarga y queda en la cabeza, las mitocondrias se colocan en el cuello y los

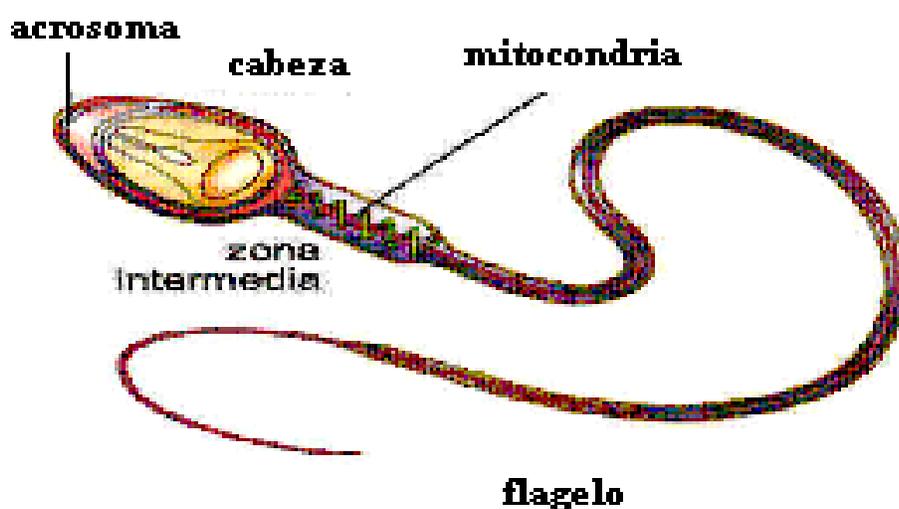
centríolos originan un flagelo, constituyendo así esta forma reproductiva, del hombre (1,2,3).



**Figura 2.** Proceso de Espermatogénesis. FUENTE: Fox S. Fisiología Humana.2003

#### 4.2 Estructura y función del espermatozoide humano

El espermatozoide de mamífero está compuesto de dos regiones principales: la cabeza y el flagelo, que se encuentran unidas entre sí por una pieza intermedia. La cabeza del espermatozoide humano es oval y mide ~ 5  $\mu\text{m}$  de largo, ~ 3  $\mu\text{m}$  de ancho y ~1,5  $\mu\text{m}$  de espesor.



**Figura 3.** Esquema de la estructura de un espermatozoide maduro humano Fuente :

[www.bioatividades.hpg.ig.com](http://www.bioatividades.hpg.ig.com)

La cabeza está ocupada en su gran mayoría por el núcleo, que contiene el ADN, donde reside la información genética paterna y además contiene el

acrosoma y residuos de algunas estructuras citoplasmáticas. El acrosoma se encuentra en la parte intermedia de la cabeza sobre el núcleo, rodeado por una membrana y se distribuye en forma de capucha sobre el núcleo; en su interior se encuentran las enzimas hidrolíticas encargadas de la degradación de la zona pelúcida que rodea al ovocito. La zona intermedia (ver figura 3) es la parte del flagelo que conecta con la cabeza y contiene a las mitocondrias. El flagelo contiene en toda su extensión al axonema, estructura responsable del movimiento flagelar, formado por un conjunto de pequeños tubos longitudinales o microtúbulos que se agrupan de a pares o dobletes y se distribuyen en un doblete central y nueve dobletes periféricos. La estructura, además de contener la zona intermedia, se divide en dos partes: la pieza principal del flagelo de ~ 45  $\mu\text{m}$  de largo sustituida por una vaina fibrosa y la pieza terminal de ~ 2  $\mu\text{m}$  de largo, es la porción final del flagelo y carece de vaina fibrosa y fibras densas. El espermatozoide en su totalidad está cubierto por la membrana plasmática que contiene un citoplasma escaso.

Evidentemente, el espermatozoide es una célula con alto grado de especialización que ha reducido la mayoría de los componentes de una célula típica, estando su mayor volumen ocupado por el núcleo (donde se encuentra el material genético). Prácticamente al resto de las estructuras clásicas de las

demás células como son los ribosomas (no presenta síntesis de proteínas) y el retículo endoplásmico, no están presentes. Este grado de especialización le confiere la capacidad de desarrollar las siguientes tareas básicas, necesarias para una fecundación exitosa:

1.- Desplazarse, para lo cual desarrolla el largo flagelo, que con movimientos en forma de latigazo permiten al espermatozoide nadar a través del tracto genital de la hembra hasta tomar contacto con el óvulo (4). En el tracto genital femenino, el espermatozoide adquiere una movilidad hiperactivada, esencial para la fecundación ya que la requiere para encontrarse con el óvulo (5,6). La hiperactivación se observa in vitro como una movilidad vigorosa y asimétrica y requiere de la presencia de calcio extracelular. En un medio viscoso como lo es el del fluido folicular que rodea al óvulo, el movimiento asimétrico se tornaría rectilíneo y muy rápido, propicio para alcanzar la zona pelúcida del óvulo.

2.- “Atacar” al óvulo. Para ello el espermatozoide debe de unirse específicamente a la estructura que rodea al óvulo, la zona pelúcida, atravesarla y fusionarse con la membrana. Para ello el espermatozoide debe

de cumplir con dos procesos, además de la hiperactivación de la motilidad, esto es: la capacitación y la exocitosis del acrosoma o reacción acrosomal (RA).

**Capacitación.** La capacitación es un proceso de activación que dura algunas horas y se lleva a cabo en el útero o en las trompas de Falopio (7), o “in vitro” en medios que contengan calcio, albúmina y bicarbonato. En este proceso se presentan una serie de cambios bioquímicos complejos entre los que destacan la producción de AMPc y la activación de proteína cinasas A y tirosina cinasas, también se presenta una ligera alcalinización y un aumento en el calcio intracelular en reposo (8,9,10). El espermatozoide capacitado, operacionalmente, se define como aquel capaz de fecundar, y por extensión, por su capacidad de responder a la ZP3, una glicoproteína de la zona pelucida del óvulo, induciendo la reacción acrosomal (4,5,6).

**Reacción acrosomal.** Esta reacción la induce fisiológicamente, la ZP3, en el momento en el que el espermatozoide capacitado entra en contacto con esta estructura del ovocito. La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis, producto de la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, que trae como consecuencia la liberación de

enzimas líticas que permiten al espermatozoide penetrar a través de la zona pelúcida del óvulo, y al mismo tiempo exponer la membrana interna. Este paso es necesario para la fusión del segmento ecuatorial del espermatozoide y de la membrana plasmática del óvulo (5).

### **4.3 Función celular del sodio**

Los canales iónicos son elementos claves en el diálogo entre el espermatozoide y su medio ambiente. La presencia y distribución de canales iónicos de calcio, sodio, potasio o cloro son fundamentales para entender las bases moleculares de funciones básicas del espermatozoide como son la movilidad, la capacitación o la exocitosis del acrosoma

Las células utilizan el gradiente de sodio, generado por la actividad de la bomba ATPasa Na, K. El gradiente es empleado por las células de acuerdo a su función. Por ejemplo, en las células excitables, el potencial de acción se dispara por una corriente de sodio activada por el voltaje. El influjo de sodio produce despolarización durante el potencial de acción. A este respecto, es interesante notar que los espermatozoides están provistos de canales iónicos, incluidos un canal de sodio dependiente de voltaje (11), que producirían

potenciales de acción. Asimismo, el gradiente de sodio sirve en virtualmente todo tipo de célula como fuerza impulsora en el transporte de metabolitos, por ejemplo el transportador de glucosa, que cotransporta glucosa utilizando el gradiente de sodio. Otro importante efecto regulador del gradiente de sodio es

la regulación del pH intracelular, a través del intercambiador Na/H. La activación de este sistema es fundamental en la activación de espermatozoides de invertebrados marinos (12) y se ha postulado que interviene en la regulación del pH en el espermatozoide de mamífero (13).

El sodio tiene un importante papel regulador en el balance hídrico de los organismos, por ejemplo, en las células epiteliales de los túbulos de la nefrona, la recaptura de sodio regula la eliminación de agua por ósmosis y mantiene el equilibrio hídrico.

#### **4.4 Papel del calcio en la función del espermatozoide humano.**

Es de destacar el requerimiento de calcio en las funciones descritas arriba. De hecho, la hiperactivación, la capacitación y la RA requieren de la presencia de calcio en el medio externo y se acompañan de aumentos en el calcio

intracelular (14,15). Estos cambios son de mayor interés en el campo, porque constituyen un mecanismo central para desentrañar las bases moleculares que intervienen en las funciones especiales que permiten al espermatozoide fecundar. Consecuentemente, los sistemas de transporte de calcio en el espermatozoide son blancos farmacológicos potenciales en el control de la fecundación.

Hasta ahora los estudios sobre la regulación del contenido de calcio intracelular del espermatozoide se han enfocado a los sistemas de entrada de calcio, principalmente en el mecanismo de la RA. Por ejemplo, existen evidencias que indican que el disparo de la RA requiere de la activación secuencial de canales de calcio dependientes de voltaje y de canales de calcio operados por vaciamiento de pozas internas (SOC, de “store operated channel”) que eleva el calcio intracelular transitoriamente. Por otra parte, no se ha dado atención a los sistemas que establecen el contenido de calcio intracelular en el reposo, que es esencial para la viabilidad celular y particularmente en el espermatozoide para que se capacite. Cabe recordar que durante la capacitación el calcio intracelular en el reposo tiende a elevarse, fenómeno que puede ser esencial para este proceso (14,15).

Los mecanismos de entrada de calcio que dan lugar a el establecimiento del calcio intracelular en el reposo, de unos 100-200 nM en el espermatozoide (y en virtualmente todas las células) es un fenómeno poco estudiado en cualquier tipo celular. En contraste, los sistemas de extrusión de calcio del citoplasma si han sido ampliamente estudiados y lo constituyen básicamente la ATPasa de calcio tanto membranal como la de almacenes internos, y el intercambiador Na/Ca membranal que intervendría especialmente a concentraciones calcio súbitamente elevadas (16). Lo que no está claro es cuál es el sistema o sistemas de entrada de calcio que contribuirían a establecer los niveles de calcio intracelular en el reposo.

#### **4.5 Regulación de la concentración de calcio intracelular en el reposo en el espermatozoide humano.**

Se ha observado que cuando el espermatozoide de ratón y humano (las especies estudiadas) se incuban en medios preparados sin calcio el potencial de membrana se despolariza (17,18). En espermatozoides de ratón el fenómeno es reversible, esto es, que la adición de calcio al medio sin calcio,

produce una hiperpolarización en el potencial de membrana (19), esto supuso que el potencial de membrana era regulado por el calcio intracelular.

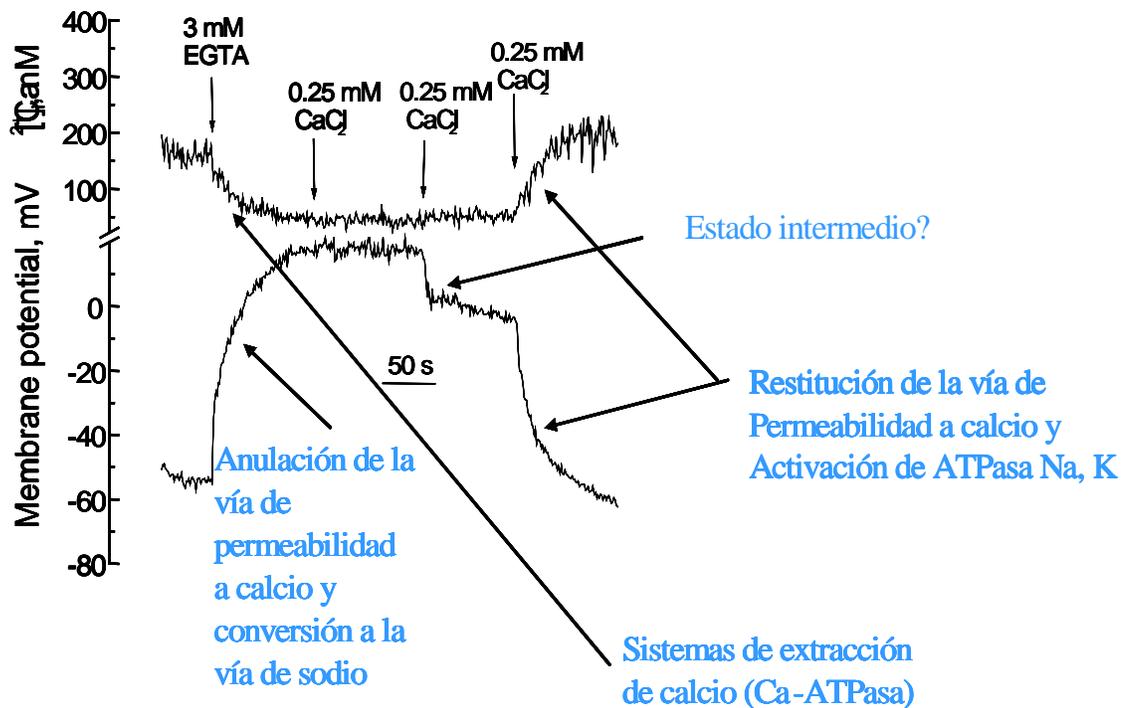
Dentro del laboratorio se ha estudiado este fenómeno en el espermatozoide humano con mayor profundidad. Utilizando un sistema de detección simultánea de potencial de membrana y calcio intracelular en poblaciones de células se encontró que la despolarización inducida por remoción de calcio del medio con 3 mM de EGTA, que reduce el calcio de 2.5 mM a  $\sim 129$  nM produce una despolarización de  $\sim 50$  mV (medida en poblaciones de espermatozoides con el detector óptico DiSC3(5)) y que esta va siempre acompañada de una reducción del calcio intracelular en el reposo. Experimentos en los que se substituyó el sodio por la colina, un catión no permeable, demostraron que la despolarización se debe a un influjo de sodio. Este influjo resultó tener una secuencia de permeabilidad de  $\text{Li} > \text{Na}$ , con no permeación de tetrametil amonio, un catión monovalente voluminoso. A pesar de la estrecha relación entre la despolarización dependiente de sodio y la disminución del calcio intracelular, se encontró que el influjo de sodio no era controlado por el calcio interno y, por eliminación de esta posibilidad, se dedujo que el sitio de control de calcio era por el lado externo de la membrana

y con una constante de disociación en el rango nM -  $\mu$ M (20). En conjunto el fenómeno es consistente con la hipótesis de que existe un canal de calcio en la membrana plasmática responsable de establecer el calcio intracelular en el reposo, como mecanismo de entrada del catión. El canal tendría un sitio de unión a calcio por el lado externo que le conferiría selectividad a calcio. Cuando se remueve el calcio, el canal cambiaría su selectividad, dejando pasar sodio y produciendo la despolarización. En esta circunstancia, la falta del mecanismo de entrada de calcio revelaría el mecanismo de extrusión que se manifiesta por una disminución, en segundos, del calcio intracelular, producto de la actividad de la Ca-ATPasa, hasta el punto de llevar el contenido de calcio a unidades o decenas de nanomolar (cercano al contenido de calcio extracelular).

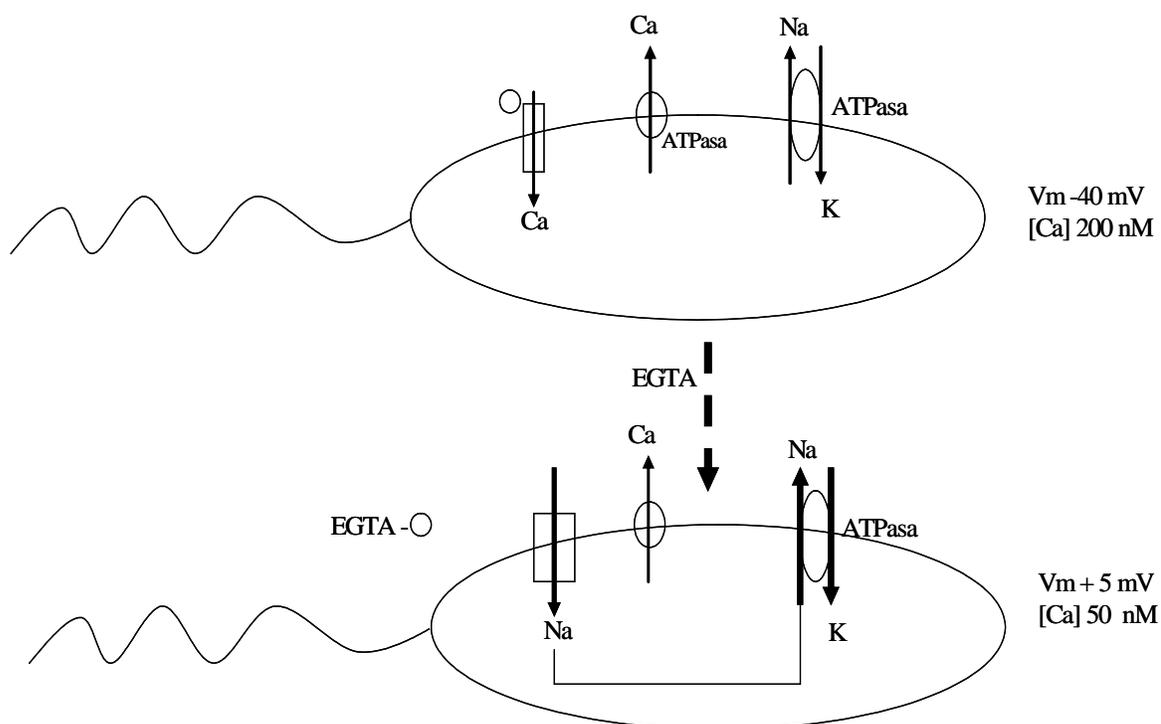
La readición de calcio al medio produce un influjo de calcio que lleva el calcio intracelular a recuperar nuevamente los valores de reposo indicando que el presunto canal recobró su selectividad a calcio. Esta recuperación se observa como un pico de calcio por arriba de los niveles de reposo seguido de una disminución a estos niveles basales. Esta recuperación se presentaría por la reactivación de la Ca-ATPasa. Concomitantemente, la despolarización se detiene y se produce una hiperpolarización, que se bloquea por ouabaina o por

la ausencia de potasio en el medio. Estas condiciones inhiben la actividad de la bomba electrógena Na,K-ATPasa por lo que se ha sugerido que la sola actividad de la bomba produce hiperpolarización (19,20). La interpretación mecánica de estos fenómenos se modela en la figura 4 y 5.

Calcio externo libre 129 nM 290 nM 8.0uM 250uM



**Figura 4.** Efecto de la remoción de calcio y la subsecuente readición de calcio sobre el potencial de membrana (gráfico de abajo) y sobre el calcio intracelular (gráfico de arriba). Se indica la interpretación mecánica del fenómeno.



**Figura 5.** Esquema del Modelo hipotético del efecto de la remoción de calcio con EGTA y su subsecuente restauración en el espermatozoide humano.

## **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **5.1 Despolarización dependiente de sodio por remoción de calcio externo en el espermatozoide. Papel del contenido de sodio intracelular en el proceso**

La despolarización inducida por la remoción de calcio externo en principio se asocia a transferencias mínimas de carga (21) que no debieran afectar el contenido de sodio durante la despolarización de 50 mV producido por un influjo electrogénico de sodio inducido por la remoción de calcio. Sin embargo, es importante recalcar que el volumen citoplasmático en el espermatozoide es extremadamente reducido, por lo que las transferencias de carga pueden afectar la concentración de sodio. La hipótesis que se plantea arriba implica que para que se active la ATPasa Na - K, la cual produce una hiperpolarización inducida por la restauración del calcio, es necesario que se presente una acumulación de sodio en el citoplasma durante la despolarización dependiente de sodio previamente inducida por la remoción de calcio. Un aumento en el sodio intracelular estimularía la ATPasa Na,K produciendo hiperpolarización, que se detectaría cuando el potencial de membrana deja de depender de la conductancia a sodio.

En este sentido, consideramos importante para la hipótesis de este proyecto medir el sodio intracelular producido durante la despolarización inducida por remoción de calcio del medio con el EGTA. Por lo tanto, se propone establecer un método de determinación de sodio intracelular con el indicador fluorescente SBFI (22,23,24) en espermatozoides humanos. Este método ya ha sido utilizado para medir el sodio intracelular en espermatozoides humanos y su respuesta a progesterona (24), sin embargo en este estudio se toman valores de curvas de calibración aparentemente lineales sin tomar en cuenta en que rango de concentraciones se satura la señal y el valor de la  $K_d$  SBFI-Na. En este sentido, consideramos que hace falta un estudio formal en el que se determinen con precisión razonable los valores de  $K_d$  de SBFI para el sodio en el espermatozoide humano. En la presente tesis, desarrollamos la metodología para detectar sodio por fluorescencia y el análisis matemático para su medición lo más exacta posible.

## **6. OBJETIVOS**

↪ Montar una técnica de medición y calibración de sodio intracelular ( $Na_i$ ) mediante el uso de sondas fluorescentes, determinar el valor de  $K_d$  del complejo SBFI-Na en espermatozoides humanos.

↪ Determinar si la despolarización dependiente de sodio inducida por remoción de calcio extracelular aumenta el sodio intracelular en espermatozoides humanos.

## **7. HIPÓTESIS**

**1.** La señal fluorescente de SBFI intracelular en el espermatozoide humano graficada en función de la concentración de sodio interno, presentará una curva hiperbólica susceptible de ser analizada en curvas linearizadas de Lineweaver-Burk y Hanes.

**2.** La despolarización dependiente de sodio inducida por remoción del calcio externo produce incrementos en el contenido de sodio intracelular detectables con el colorante óptico para sodio (SBFI). La subsecuente reposición de calcio produciría un decremento en el sodio intracelular a nivel basal.

## **8.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

### **8.1 Población de estudio**

Seis donadores sanos de 20 a 35 años de edad.

### **8.2 Criterios de**

#### **8.2.1 Inclusión**

Selección de muestras de semen que cumplan con las siguientes características:

- 1) Donadores de 20 – 35 años de edad
- 2) Color blanco grisáceo
- 3) Tiempo de licuefacción de 20-60 minutos a temperatura ambiente
- 4) Volumen de > 3 ml.
- 5) pH de 7.2-7.8
- 6) Movilidad y viabilidad  $\geq 60\%$
- 7) Ausencia de aglutinación
- 8) Concentración de leucocitos no mayor a  $10^6/\text{ml}$
- 9) Contenido de espermatozoides  $> 8 \times 10^6/\text{eyaculado}$

### **8.2.2 Exclusión**

- 1) Donadores menores de 18 años y mayores de 35 años
- 2) Donadores con alguna infección u otra enfermedad
- 3) Concentración de espermatozoides  $< 8 \times 10^6$ /eyaculado
- 4) Volumen  $< 3$  ml
- 5) pH  $< 7.2$  y  $> 7.8$
- 6) Movilidad y viabilidad  $\leq 60$  %
- 7) Presencia de aglutinación
- 8) Concentración de leucocitos mayor a  $10^6$ /ml

### **8.3 Variables**

- Contenido de calcio y sodio en el medio de registro

**8.4 Material**

<b>Reactivos</b>	<b>Especificación</b>
Agua desionizada	
Percoll	al 75 y 50%, pH 7.4
(SBFI)	Disuelto en dimetilsulfoxido
Gramicidina	Disuelto en dimetilsulfoxido
Ácido plurónico	0.06% en H-HSM
NaCl	
(EGTA)	Disuelto en NaOH 2.5M con un pH 7.6

<b>Equipo</b>	<b>Especificación</b>
Espectrofluorómetro (PTI)	
Filtro de corte	500 nm
Balanza analítica	
Potenciómetro	calibrado
Pipetas	1ml, 200 $\mu$ l, 20 $\mu$ l
Probeta	Limpias y de vidrio (50 ml)
Vasos de precipitado	Limpios y de vidrio (100ml)
Centrifuga	

<b>Medios</b>	<b>Especificación</b>
(H-HSM)	De la siguiente composición (mM): 117.5 NaCl, 8.6 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 0.3 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.49 MgCl <sub>2</sub> , 0.3 piruvato de sodio, 19 lactato de sodio, 2 glucosa, y 25 HEPES-Na (pH 7.6 amortiguado con HEPES)
Medio de colina bajo en sodio	con la siguiente composición: (mM)117.5 Cloruro de colina, 8.6 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 0.3 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.49 MgCl <sub>2</sub> , 0.3 piruvato de soido, 19 lactato de sodio, 2 glucosa, y 25 HEPES-Na (pH 7.6 amortiguado con HEPES)
Medio intracelular	de la siguiente composición (mM): 120 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 0.49 MgCl <sub>2</sub> , 2 glucosa (pH 7.6 amortiguado con TRIZMA)

## **9. METODOLOGÍA**

**9.1 Composición de los medios y reactivos:** Se utilizaron principalmente dos medios, el H-HSM (de “Hepes buffered-human sperm medium”) que contiene en mili molar lo siguiente: NaCl 117.5, KCl 8.6, CaCl 2.5, MgCl<sub>2</sub> 0.49, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, glucosa 2, Na-piruvato 0.25, Na-lactato 25 y HEPES 25, pH 7.6 ajustado con NaOH. El medio MI-HSM (“medio intracelular”) contuvo, en mili molar: KCl 120, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgCl<sub>2</sub> 0.49, glucosa 2, pH 7.6 mantenido con 10 mM de TRIZMA base. El compuesto fluorescente SBF1 – AM y ácido plurónico F-127 se obtuvieron de Molecular Probes. Los reactivos utilizados para la composición del medio H-HSM, el MI-HSM y el Percoll para la obtención de espermatozoides fueron de SIGMA o Merck.

**9.2. Obtención de muestras:** Las muestras de semen se obtuvieron de seis donadores sanos de entre 20-35 años de edad. Los criterios de selección de las muestras se realizaron de acuerdo al manual de la Organización Mundial de la Salud (25), mediante espermatobioscopias.

La espermatobioscopia es un examen clínico del semen en su conjunto, en donde se analiza tanto el líquido seminal así como la producción de espermatozoides y la función de las glándulas sexuales. Este análisis consta de varios pasos, los cuales se dividen en:

1. Aspecto fisicoquímico; donde se determina:

- ☞ Tiempo de licuefacción
- ☞ Aspecto del semen
- ☞ Volumen
- ☞ Coágulo
- ☞ Turbidez
- ☞ Viscosidad
- ☞ PH

2. Análisis microscópico, donde se determina:

- ☞ Movilidad
- ☞ Viabilidad
- ☞ Densidad
- ☞ Cuenta total
- ☞ Aglutinación

3. Análisis morfológico, donde se determina:

- ☞ Formas normales
- ☞ Defectos de: cabeza, flagelo, pieza intermedia, células inmaduras.

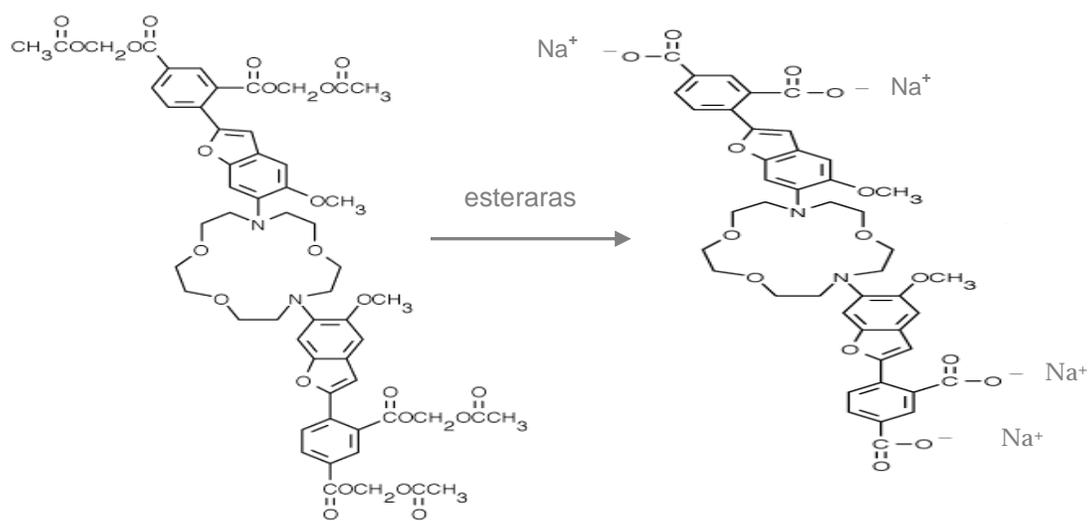
Además se realiza un estudio de los sedimentos del semen como son: leucocitos, eritrocitos y células epiteliales.

Si el conteo es muy bajo o muy alto existe la posibilidad de ser menos fértil. El porcentaje de espermatozoides normales tiene también un efecto en la fertilidad. La acidez del semen y la presencia de leucocitos sugieren una infección y además ejercen en cierta medida efecto en la infertilidad (26,27,28). Es notorio que la realización de la prueba de espermatozoides nos presenta si existe algún problema en la producción o calidad de los espermatozoides como una causa de infertilidad. Para este estudio solo se seleccionaron las muestras que cumplieron con las siguientes características de normalidad: color de semen blanco grisáceo, tiempo de licuefacción de 20 – 60 minutos a temperatura ambiente, volumen de > 3 ml, pH de 7.2 – 7.8, movilidad y viabilidad  $\geq$  al 60%, ausencia de aglutinación. En cuanto al número de células, solo se seleccionaron donadores con un contenido de células mayor a 100 millones por eyaculado.

**9.3 Purificación de los espermatozoides:** Las muestras de semen se incubaron a 37 ° C para reducir su viscosidad. Posteriormente se sometieron a gradientes isotónicos de densidad discontinuos de Percoll (29), formado por 1 ml de Percoll al 75% en el fondo de un tubo cónico de centrifuga y sobre este 1ml de Percoll al 50%, ambas soluciones amortiguadas a pH 7.4 con HEPES 10 mM y con osmolaridad mantenida con NaCl 150 mM; se colocó el semen y se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos. El material por encima del Percoll a 75% (que contienen leucocitos y células espermatozoides) fue eliminado y se recuperó la pastilla del fondo, que contiene espermatozoides en alto grado de pureza y movilidad. Esta fracción se lavó por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos en medio H-HSM. Las células se resuspendieron en 1 ml de este medio e inmediatamente después se cargaron con SBFI.

**9.4 Carga de los espermatozoides con el detector de sodio SBFI.** Las células purificadas (~ 100 millones) se cargaron con 25 µM del derivado acetoximetil éster de SBFI-AM por 90 minutos a 37 ° C en presencia del agente detergente dispersante ácido plurónico (0.6 %). Este derivado es permeable a las células y en este tiempo de incubación se incorporan al citoplasma, y ahí las esterasas separan el acetoximetilo,

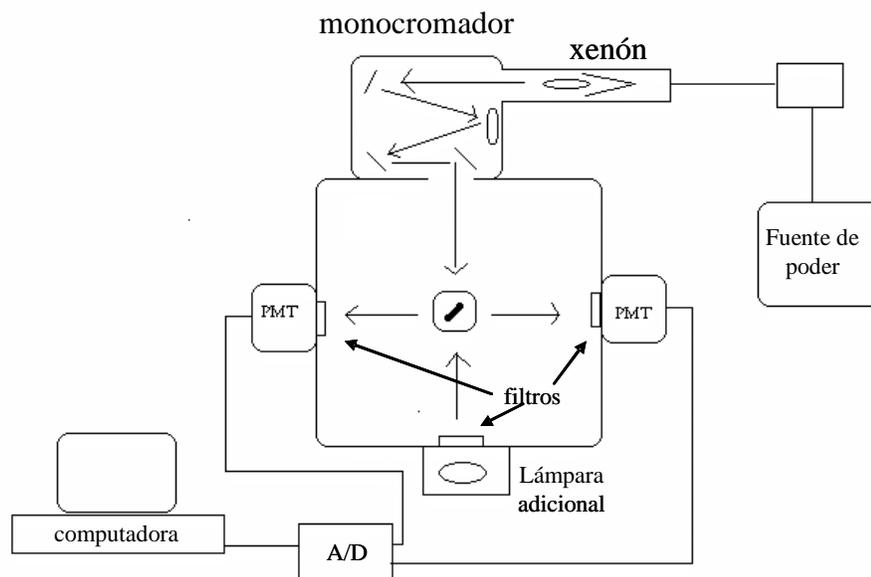
haciendo al colorante sensible al sodio (figura 3). Las células se lavaron por centrifugación en medio H-HSM, se resuspendieron en 25 ml del mismo medio a 36 °C. La unión al sodio cambia las propiedades espectroscópicas del SBFI de manera que la fluorescencia detectada a 500 nm aumenta ligeramente cuando se excita a 340 nm y disminuye notablemente cuando se excita a 380 nm. La relación de estas fluorescencias se utilizó para la calibración de la señal.



**Figura. 6.** Estructura molecular del SBFI-AM y SBFI unido a sodio. El SBFI-AM tiene la propiedad de entrar al interior de las células, donde por la actividad de las estereras es transformado a SBFI con cargas negativas aportadas a por sus grupos carboxílicos, lo cual le permite quelar al sodio y aumentar y disminuir su fluorescencia al ser excitada a 340 y 380 nm, respectivamente (31).

La medición de la fluorescencia de SBFI en células cargadas se realizó en un espectrofluorómetro PTI (“Photon Technology International”) (ver figura 6). Este equipo está formado por una caja protegida de la entrada de luz, a excepción de cuatro aperturas, dos para la excitación de la muestra y dos para coleccionar la fluorescencia emitida y en el centro contiene un portacelda con agitación magnética constante y temperatura regulable a través de un baño de incubación.

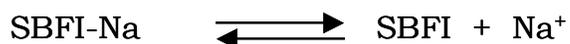
En nuestro caso únicamente se utilizó una ventana de emisión y una ventana de doble excitación, que provee el monocromador de excitación del equipo y su fuente de irradiación de Xenon.



**Figura 7.** Esquema del Sistema de detección de fluorescencia utilizado en el presente trabajo.

**9.5 Medición de fluorescencia en espermatozoides.** Se tomó ~ 2.5 ml de las células cargadas y se centrifugaron a 2500 rpm. El pellet de células (~ 20 millones) se añadió a la celda fluorescente que contenía 2.5 ml del medio, bajo agitación magnética continua y termostatizada a 36 °C. Se detectó la fluorescencia con un filtro de interferencia óptica a valores > 490 nm, excitada alternadamente a 340 y 380 nm y la relación 340/380 con una frecuencia de 0.85 Hz. Se prefirió usar un filtro de interferencia óptica sobre un filtro de determinada longitud de onda para optimizar la lectura de fluorescencia, que es de una intensidad más bien débil. Después de 3 minutos de estabilización de la señal se añadieron los aditivos apropiados.

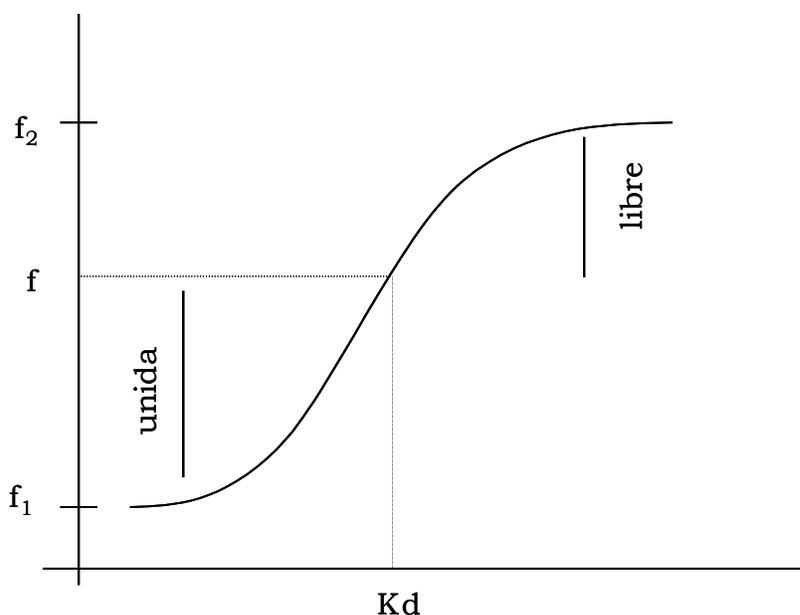
**9.6 Calibración de la señal de sodio:** La transformación de los valores de fluorescencia en contenido de sodio obtenidos de los registros, en mili molar, parte de las siguientes consideraciones. El complejo SBFI-Na se disocia en la forma libre más el sodio de la siguiente manera:



De la forma libre y unida a sodio del fluoróforo SBFI se obtiene el valor de Kd, el cual es igual al producto de la concentración de SBFI y de sodio sobre la concentración del complejo SBFI-Na, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Kd = \frac{[SBFI] [Na]}{[SBFI-Na]} \dots\dots (1)$$

Esta expresión se encuentra establecida en función de las fracciones de los compuestos libres (SBFI y sodio) y unidos (SBFI-Na), como se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Gráfica que representa los valores de fluorescencia del fluoróforo libre y unido en función del logaritmo de la concentración de Na, f<sub>min</sub> es la fluorescencia mínima donde no hay sodio unido a SBFI y f<sub>max</sub> es la fluorescencia máxima donde se presenta una saturación de SBFI por el sodio. La K<sub>d</sub> es el valor de Na en la que el contenido de SBFI-Na y de SBFI son exactamente iguales.

Tomando como base la gráfica de la figura 8 es posible convertir la ecuación anterior en términos de fluorescencia:

$$Na = Kd \frac{f - f_{min}}{f_{max} - f} \dots (2)$$

Donde:

$f - f_{min}$  es el valor del complejo SBFI-Na

$f_{max} - f$  es el valor del fluoróforo SBFI

Para determinar el valor de sodio con dos fluorescencias, a 340 nm y 380 nm, es necesario tomar en cuenta la fluorescencia emitida a estas longitudes de onda. Asimismo, se toma en cuenta que la fluorescencia a 340 y la fluorescencia a 380 están en función de la concentración del fluoróforo. Además, la fluorescencia total a 340 y a 380, es igual a la suma de la fluorescencia unida a sodio ( $f_b$ ) más la fluorescencia libre de sodio ( $f_f$ ), con lo que:

$$f_{340} = C_{ff} \cdot f_{340f} + C_{fb} \cdot f_{340b} \dots (3)$$

$$f_{380} = C_{ff} \cdot f_{380f} + C_{fb} \cdot f_{380b} \dots (4)$$

En donde:

$C_{ff}$  es la concentración de SBFI libre

$C_{fb}$  es la concentración de SBFI unido a sodio

$f_{340f}$  es la fluorescencia de SBFI libre excitado a 340 nm

$f_{380f}$  es la fluorescencia de SBFI excitado a 380 nm

$f_{340b}$  es la fluorescencia SBFI unido a sodio excitado a 340 nm

$f_{380b}$  es la fluorescencia SBFI unido a sodio excitado a 380 nm

Para obtener el valor de la relación 340/380 nm se dividen los valores de las fluorescencias a 340 nm entre las obtenidas a 380 nm como sigue a continuación:

$$\frac{f_{340}}{f_{380}} = \frac{C_{ff} \cdot f_{340f} + C_{fb} \cdot f_{340b}}{C_{ff} \cdot f_{380f} + C_{fb} \cdot f_{380b}} \quad \dots \dots (4)$$

Dado que SBFI =  $C_{ff}$  y SBFI-Na =  $C_{fb}$ , la ecuación 2 se puede expresar así:

$$C_{ff} = \text{SBFI} = \frac{Kd \cdot C_{fb}}{Na} \quad \dots \dots (5)$$

y se substituye  $C_{ff}$  de la ecuación (5) en la  $C_{ff}$  de la ecuación (4), se obtiene lo siguiente:

$$\frac{f_{340}}{f_{380}} = \frac{\frac{Kd \cdot C_{fb}}{Na} \cdot f_{340f} + C_{fb} \cdot f_{340b}}{\frac{Kd \cdot C_{fb}}{Na} \cdot f_{380f} + C_{fb} \cdot f_{380b}} \quad \dots \dots (6)$$

Acomodando la ecuación en términos semejantes:

$$\frac{f_{340}}{f_{380}} = \frac{C_{fb}(Kd/Na \cdot f_{340f} + f_{340b})}{C_{fb}(Kd/Na \cdot f_{380f} + f_{380b})}$$

$$\frac{f_{340}}{f_{380}} \left[ \frac{Kd}{Na} \cdot f_{380f} + f_{380b} \right] = \frac{Kd \cdot f_{340f}}{Na} + f_{340b} \quad \dots \dots (7)$$

Al dividir la ecuación (7) entre  $f_{380f}$

$$R \cdot Kd/Na + \frac{R \cdot f_{380b}}{f_{380f}} = \frac{Kd \cdot Rmin}{Na} + \frac{f_{340b}}{f_{380f}} \quad \dots \dots (8)$$

donde,

$$R = \frac{f_{340}}{f_{380}}$$

$$Rmin = \frac{f_{340f}}{f_{380f}}$$

Si dividimos la ecuación (8) entre  $f_{380b}$  se obtiene:

$$\frac{R \cdot Kd}{Na \cdot f_{380b}} + \frac{R}{f_{380f}} = \frac{Kd \cdot Rmin}{Na \cdot f_{380b}} + \frac{Rmax}{f_{380f}}$$

donde,

$$Rmax = \frac{f_{340b}}{f_{380b}}$$

Reacomodando los términos de la ecuación obtenemos:

$$\frac{R \cdot Kd}{Na \cdot f_{380b}} - \frac{Kd \cdot Rmin}{Na \cdot f_{380b}} = \frac{Rmax}{f_{380f}} - \frac{R}{f_{380f}}$$

y

$$\frac{Kd}{Na \cdot f_{380b}} (R - R_{min}) = \frac{1}{f_{380f}} (R_{max} - R)$$

$$(R_{max} - R) \frac{Na \cdot f_{380b}}{f_{380f}} = Kd (R - R_{min})$$

De la ecuación anterior despejamos [Na] se obtiene la ecuación de Grynkievicz:

$$[Na] = Kd \left[ \frac{Kd (R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \frac{f_{380f}}{f_{380b}} \dots \dots (9)$$

La relación  $f_{380f} / f_{380b}$  es una constante frecuentemente denominada  $\beta$

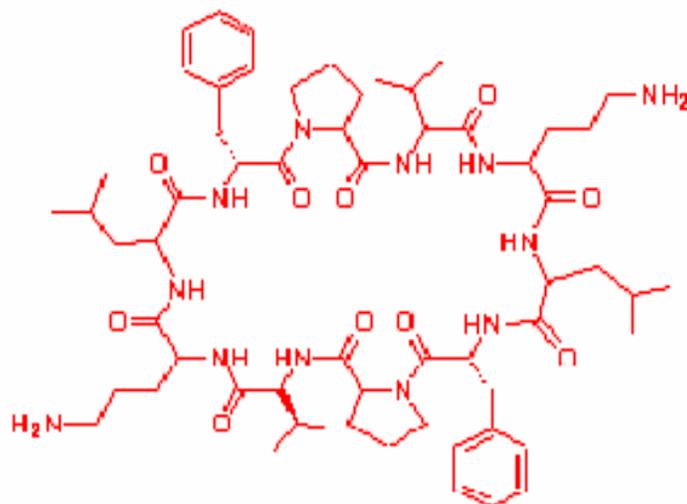
$$[Na] = \beta Kd \left[ \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right] \dots \dots (10)$$

En resumen, la ecuación de Grynkievicz tiene varias constantes definidas de la siguiente manera:

- $\beta$  es la relación que existe entre el valor de fluorescencia excitada a 380 nm, libre ( $Sf_2$ ), donde no hay presencia de sodio, y unido ( $Sb_2$ ), con sodio en saturación.
- $K_d$  es la constante de disociación
- $R_{min}$  es la relación de fluorescencia mínima. Se obtuvo en la determinación en un medio sin sodio con 5  $\mu$ M de Gramicidina

- **R<sub>max</sub>** es la relación de fluorescencia máxima. Se obtuvo con el ionóforo de sodio Gramicidina a concentraciones saturantes de sodio y a partir de una gráfica de Hanes (ver mas adelante)
- **R** es la relación de las fluorescencias detectadas a 500 nm excitado a 340/380.

**Calibración.** La calibración se realizó con el ionóforo catiónico Gramicidina el cual iguala las concentraciones externas e internas de sodio y potasio en la célula. Dada su falta de especificidad para sodio y al hecho de que el SBFI tiene cierta sensibilidad a potasio, la calibración se hizo en un medio de composición parecida al medio intracelular, de manera que la Gramicidina no indujera cambios en el contenido de potasio intracelular, sino solamente los cambios en el contenido de sodio. El medio MI-HSM se suplementó con diferentes cantidades de sodio (0.55 - 100.55 mM) manteniendo la fuerza iónica constante con colina de manera que Na + colina = 100.55 mM. En estos medios se detectaron los cambios producidos por la adición de 5 µM de Gramicidina (Stock 1 mM en DMSO). En estas condiciones la Gramicidina igualó el contenido externo e interno de sodio de manera que nos permitió asignar un valor de R (relación de fluorescencia 340/380) a cantidades conocidas de sodio. El análisis de estos datos se detallan en el siguiente apartado.



**Figura 9.** Estructura de la Gramicidina, ionóforo catiónico, el cual forma canales en la membrana con lo que permite el transporte de cationes monovalentes.

**9.7 Obtención de  $\beta$ ,  $K_d$ ,  $R_{min}$  y  $R_{max}$ :** Los valores de  $Sf_2$  y  $R_{min}$  se obtuvieron experimentalmente en medio MI-HSM preparado sin sodio. Los valores de  $R_{max}$  y  $Sb_2$  se obtuvieron analíticamente de la transformación de la ecuación (10) en ecuación de Michaelis-Menten y sus formas linearizadas, la ecuación de Lineweaver-Burk y ecuación de Hanes, siguiendo la siguiente deducción de las ecuaciones:

Tomando en cuenta la ecuación (10)

$$[Na] = \beta Kd \left[ \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right]$$

$$[Na] = \beta Kd \left[ \frac{R - R_{min}}{(R_{max} - R_{min}) + (R_{min} - R)} \right]$$

$$[Na] (R_{max} - R_{min}) + [Na] (R_{min} - R) = \beta Kd (R - R_{min})$$

$$[Na] (R_{max} - R_{min}) = \beta Kd (R - R_{min}) + [Na] (R - R_{min})$$

Factorizando la ecuación:

$$[Na] (R_{max} - R_{min}) = (R - R_{min}) (\beta Kd + [Na])$$

Despejando  $R - R_{min}$  se obtiene la ecuación análoga para una cinética enzimática de Michaelis-Menten:

$$R - R_{min} = \frac{[Na] (R_{max} - R_{min})}{\beta Kd + [Na]} \dots \dots (11)$$

Si se aplican recíprocas a la ecuación de Michaelis-Menten se obtiene la ecuación de Lineweaver-Burk (ecuación 12), y se multiplica por  $[Na]$  finalmente se obtiene la ecuación de Hanes (ecuación 13)

$$\frac{[Na]}{(R - R_{min})} = \frac{\beta K_d}{(R_{max} - R_{min})} + \frac{[Na]}{(R_{max} - R_{min})} \dots [12]$$

$$\frac{1}{(R - R_{min})} = \frac{\beta K_d}{[Na] (R_{max} - R_{min})} + \frac{(1)}{(R_{max} - R_{min})} \dots (13)$$

Al graficar  $Na/(R-R_{min})$  vs  $Na$  (Ecuación de Hanes) se obtiene una línea recta en donde:

$$m = \text{pendiente} = (1/R_{max}-R_{min})$$

$$b = \text{intercepto} = \beta K_d / (R_{max}-R_{min}).$$

De esta ecuación se obtuvo la  $R_{max}$  del inverso de la pendiente y del valor de  $R_{min}$ , estimado en experimentos hechos en medio sin sodio. Asimismo, el valor  $\beta K_d$  se obtuvo del intercepto de la curva y la pendiente  $(1/R_{max}-R_{min})$ .

Además también se obtuvo la  $K_d$  del análisis de la curva de Lineweaver-Burk, esto es de la recta que resulta de graficar  $1/(R-R_{min})$  vs  $1/Na$  (ecuación 13). El intercepto es igual a  $1/(R_{max}-R_{min})$ , de donde obtenemos analíticamente la  $R_{max}$ . La pendiente es igual a  $\beta K_d / (R_{max}-R_{min})$ , de donde obtenemos el valor de  $\beta K_d$ .

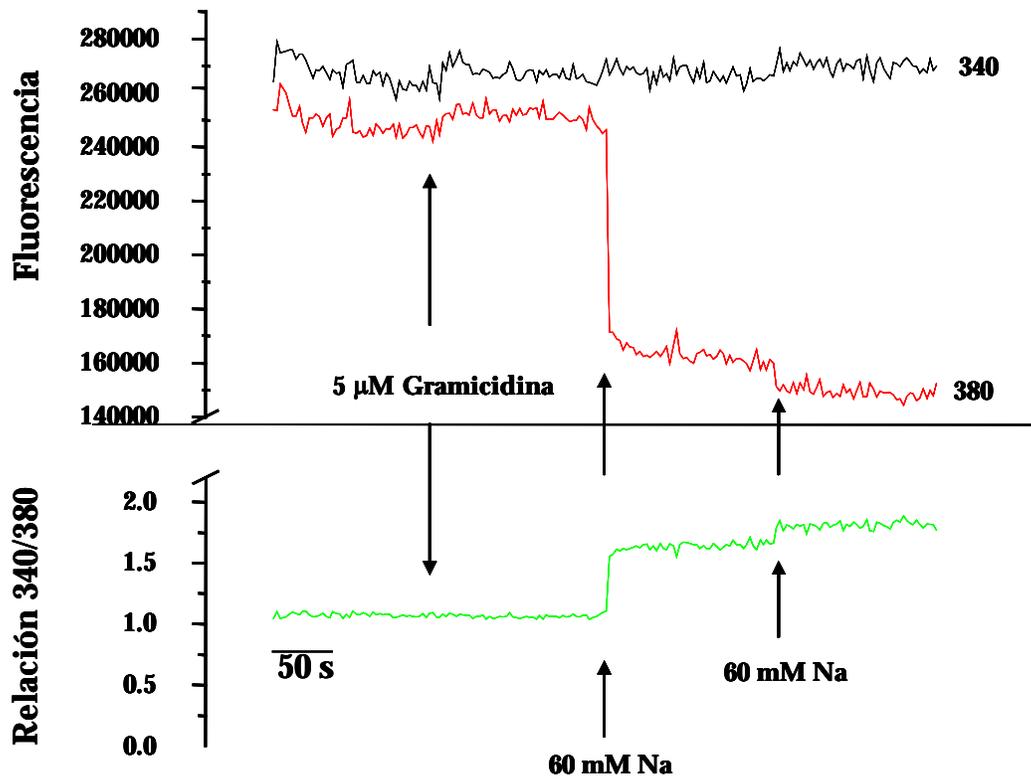
El valor  $\beta$  ( $f_{380f}/f_{380b}$ ), y de aquí la  $K_d$  del SBFi por el  $[Na]_i$  en el espermatozoide, se obtuvo a partir del dato experimental  $Sf_2$  y de un ajuste similar a la ecuación (12)

en la que se grafica  $[Na] / f_{380}$  vs  $[Na]$ . Esta es una curva lineal con una pendiente  $= 1/(f_{380max}-f_{380min})$ .

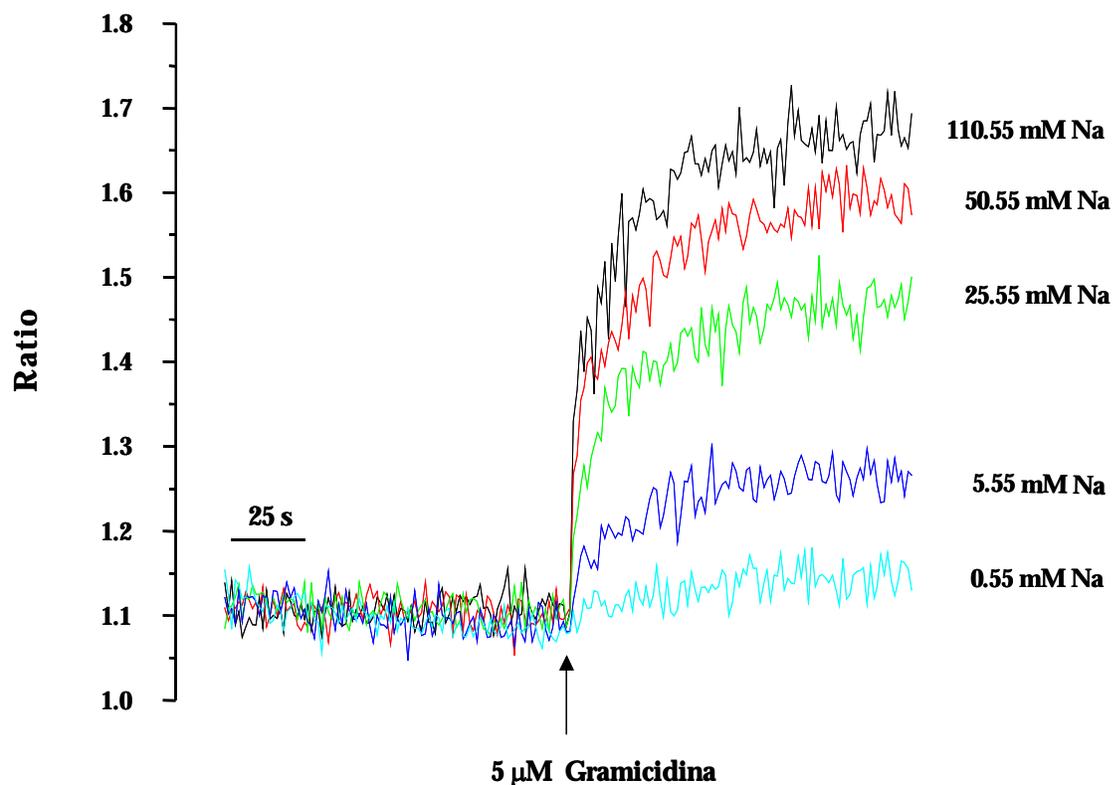
### **9.8 Diseño estadístico**

Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente por medio de la prueba de t-student pareada. Los valores de  $P < 0.05$  (con una  $n = 4$ ) para cada prueba se consideraron significativos

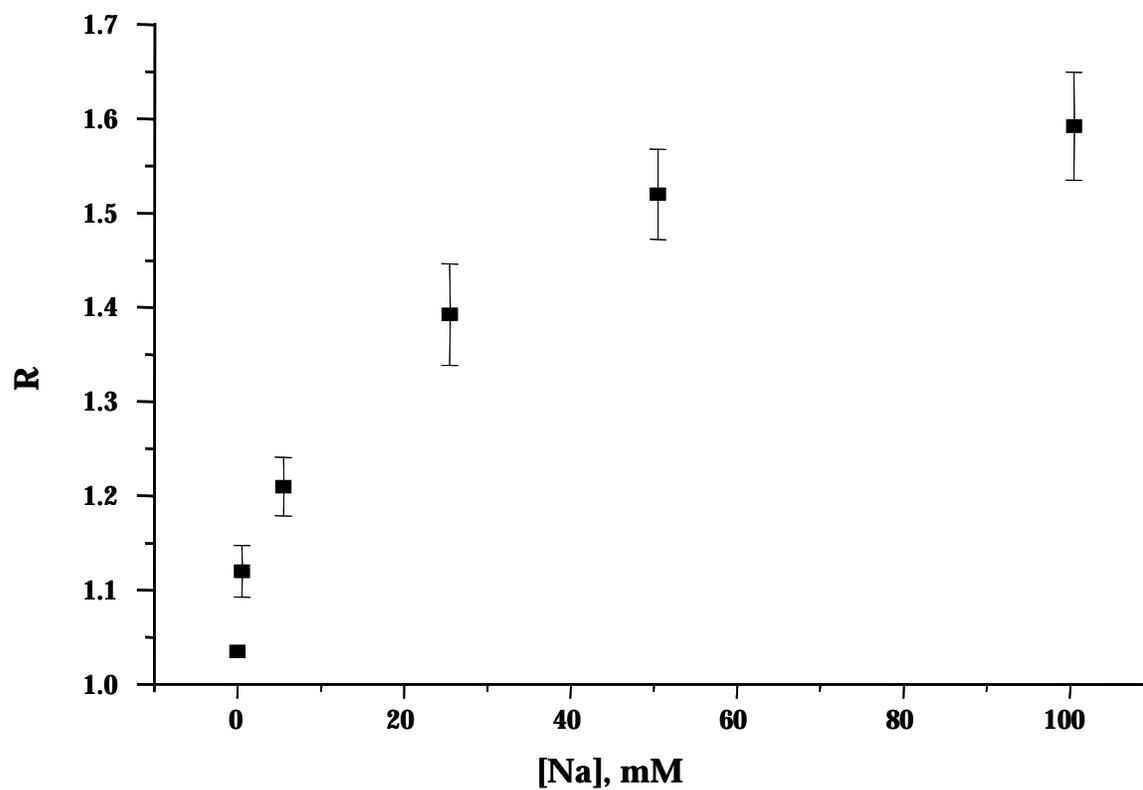
10. RESULTADOS



**Figura 10.** Señal de fluorescencia detectada a  $> 490$  nm y excitada a 340 y 380 nm en espermatozoides humanos cargados con SBF1 (panel superior). La relación 340/380 se muestra en el panel inferior. Se adicionó Gramicidina y dos cantidades de sodio (60 mM) como se indica.

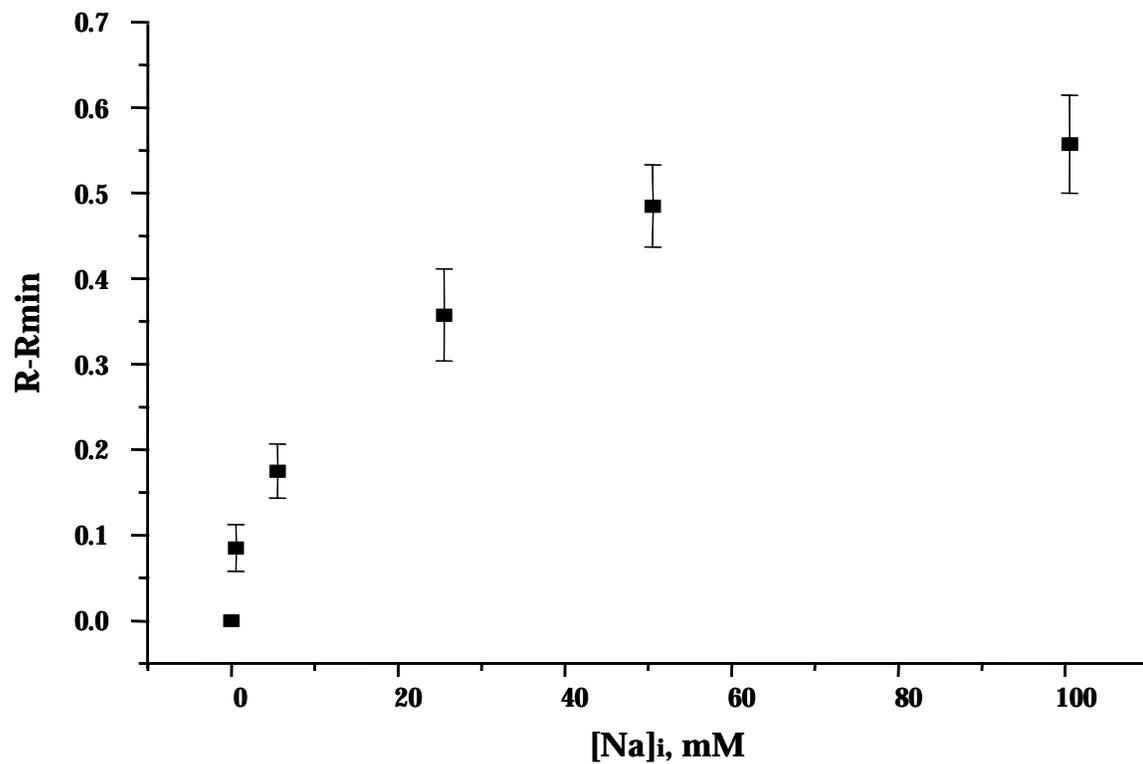


**Figura 11.** Efecto de la Gramicidina en la relación 340/380 en la fluorescencia de espermatozoides cargados con SBF1 en medios IM-HSM suplementado con las cantidades indicadas de sodio (0.55 a 100.55 mM). Después de un minuto de registro se añadió Gramicidina como se indica.

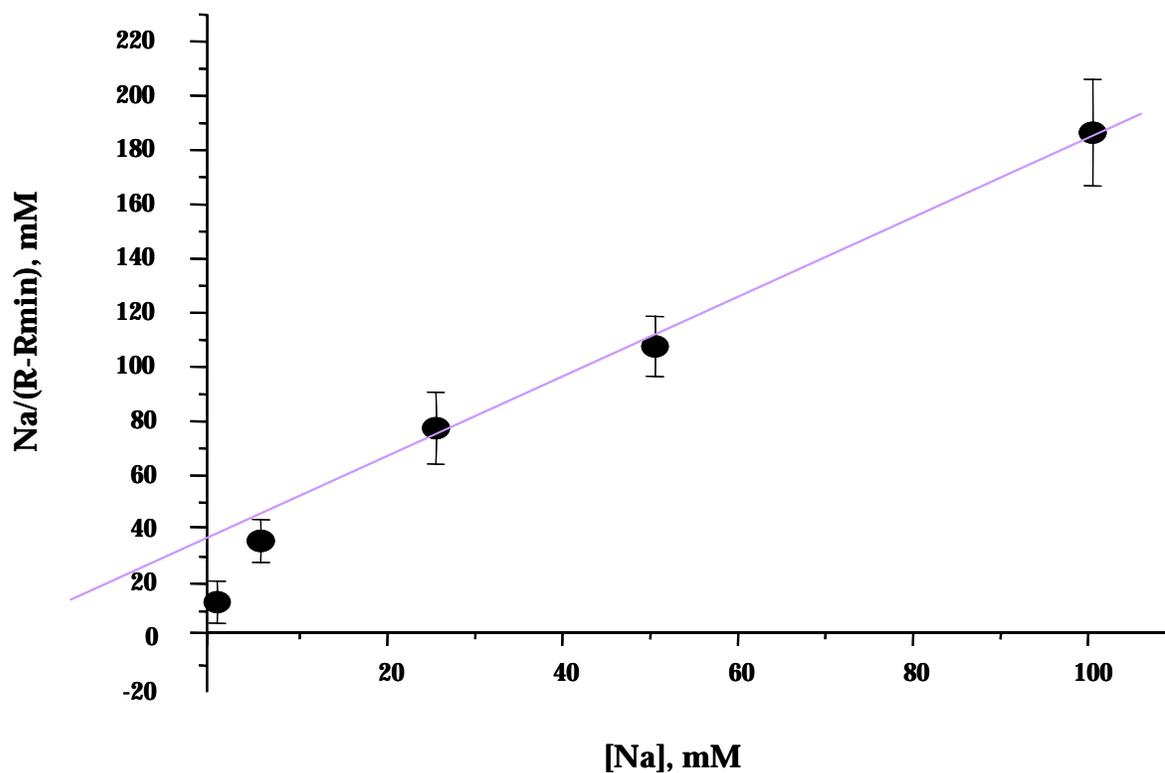


**Figura 12.** Curva de R (relación 340/380) en función de la concentración de sodio. Es una curva obtenida de cuatro calibraciones experimentales que nos da como resultado una curva hiperbólica.

**10.1 Calibración de la señal. Obtención de  $R_{max}$ ,  $R_{min}$ ,  $\beta$  y  $K_d$ .**



**Figura 13.** Gráfica donde la  $R - R_{min}$  está en función del sodio externo, tomando en cuenta la ecuación de Michaelis-Menten. Se presenta una curva hiperbólica obtenida de cuatro calibraciones experimentales.



**Figura 14.** Gráfica de Hanes de la calibración de los datos mostrados en la figura 5, la línea continua es un gráfica de regresión lineal de los puntos indicados.  $R_{max}$  es mostrada de la pendiente que es igual a  $1 / (R_{max} - R_{min})$  y  $\beta K_d$  fue obtenida por el valor del intercepto de la abscisa.

10.2 Análisis de la gráfica de Lineweaver-Burk.

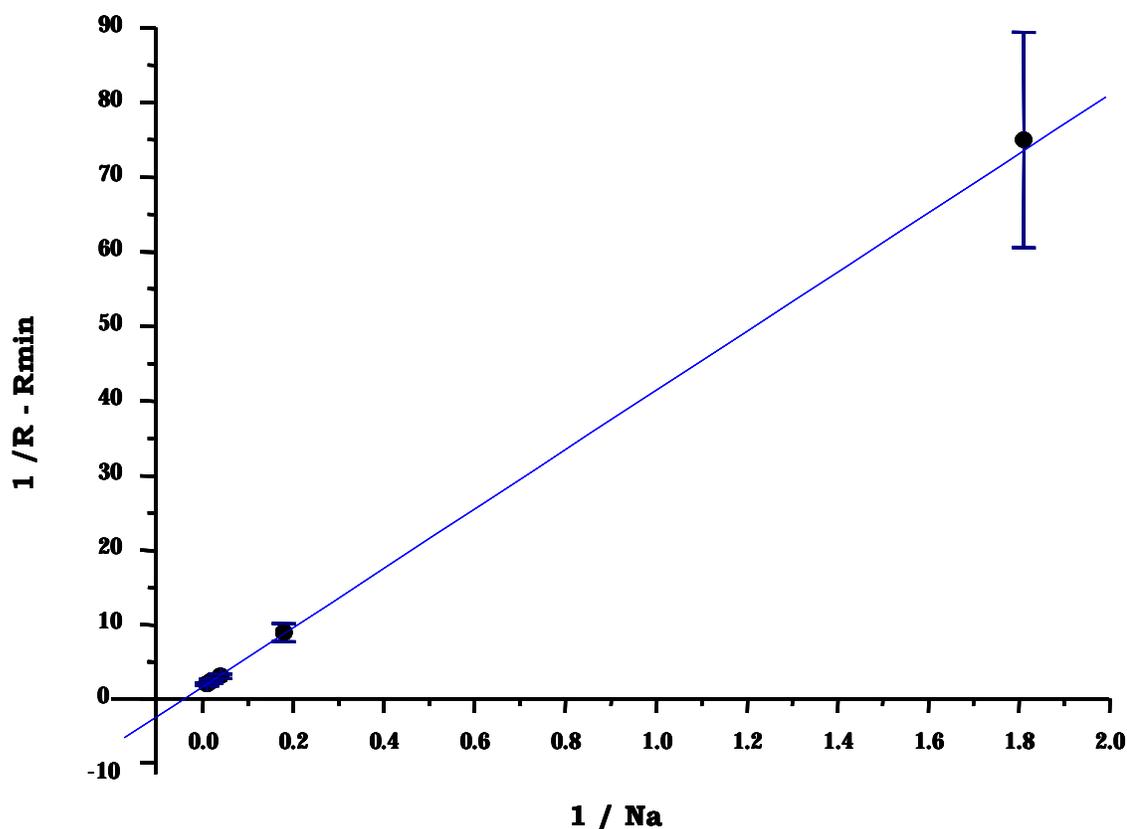


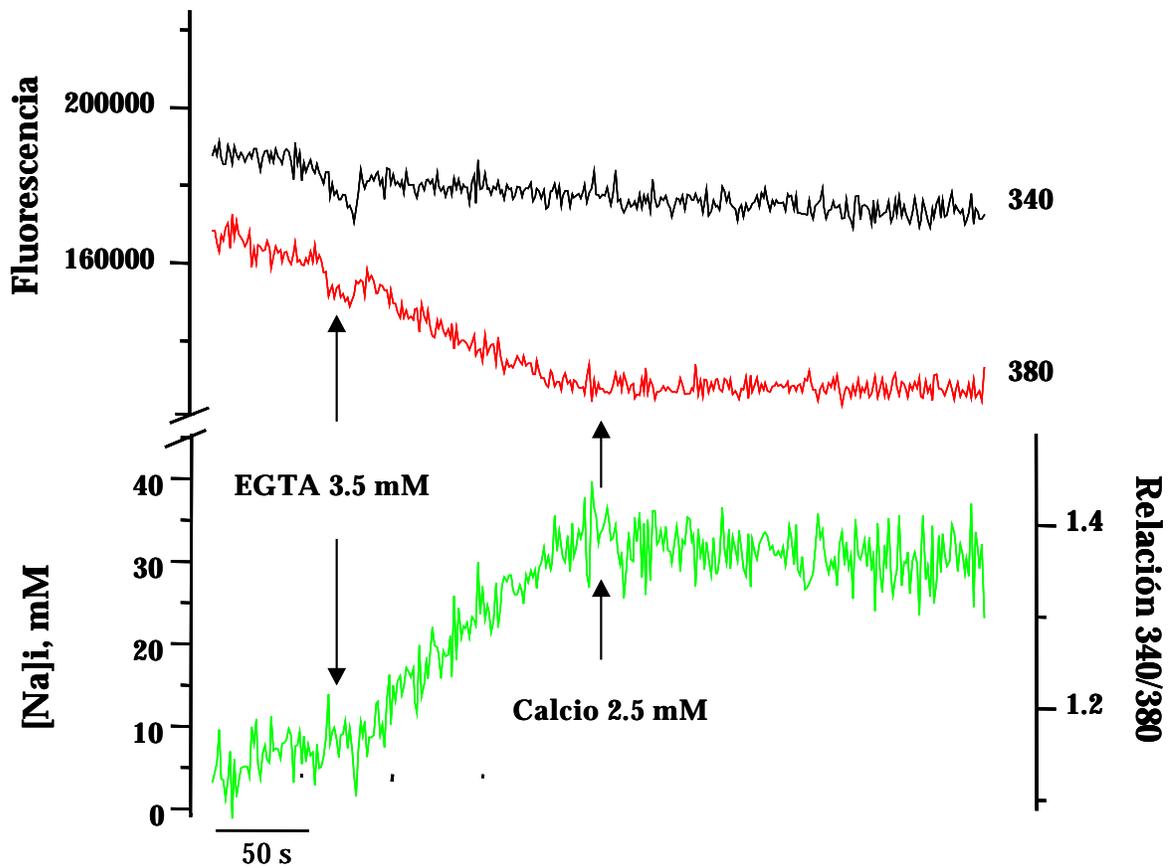
Figura 15. Gráfica de los inversos de la  $R - R_{min}$  en función del inverso de la concentración de sodio externo, la cual nos permite linearizar los datos

TABLA 1

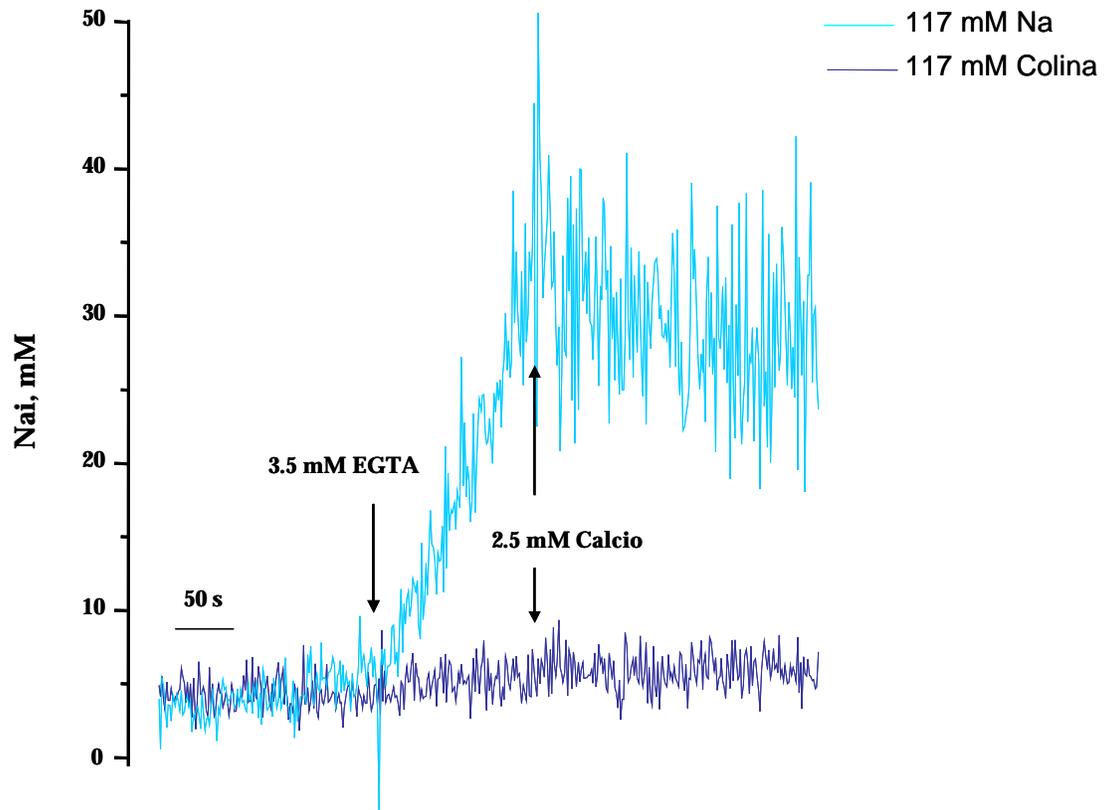
Comparación de los parámetros de  $K_d$  y  $R_{max}$  obtenidos de dos métodos

Ecuación / Parámetro	Hanes	Lineweaver-Burk
$K_d$	$15.29 \pm 2.87$	$15.9 \pm 4.37$
$R_{max}$	$1.64 \pm 0.06$	$1.64 \pm 0.06$

**10.4 Efecto de la remoción de calcio extracelular en el contenido de sodio intracelular en el espermatozoide.**



**Figura 16.** Efecto de la remoción de calcio y su restauración en un medio que contenía 117.5 mM de sodio. Los trazos de arriba representan la fluorescencia de SBFI excitada a 340 y 380 y el trazo de abajo representa la relación 340/380.



**Figura 17.** Efecto de la remoción de calcio externo con EGTA y la subsecuente restauración sobre la concentración de sodio intracelular, en un medio con 0 mM de sodio y con 117.5 mM de sodio.

## **11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La figura 10 muestra la fluorescencia emitida a  $> 490$  , excitada a 340 y a 380 nm, y la relación 340/380 de espermatozoides cargados con SBFI en medio intracelular (MI-HSM) sin sodio. El valor basal de fluorescencia a 340 fue ligeramente superior al detectado a 380 nm, dando un valor de relación 340/380 ligeramente superior a la unidad.

En este medio, la adición del ionóforo catiónico Gramicidina no produjo cambios notables en la fluorescencia excitada a ambas longitudes de onda. Al adicionar 60 mM de sodio se produjo un ligero aumento en la longitud de onda a 340 nm, y una notable disminución a 380 nm que consecuentemente aumentó la relación 340/380 a valores cercanos a 1.5, lo cual fue consistente con un aumento en el sodio intracelular. Una posterior adición de 60 mM de Na produjo un aumento en la relación 340/380 pero de menor magnitud que la primera indicando cercanía a saturación. Es importante recalcar que la fluorescencia emitida durante la excitación a 340 nm fue solo ligeramente incrementada por cambios en la concentración de sodio extracelular, en tanto que durante la excitación a 380 nm, la fluorescencia emitida disminuyó de manera proporcional a la concentración de sodio. El cambio notable a 380 y pequeño a 340 nm se ha observado también en otros sistemas (32-38).

La calibración se hizo en el medio intracelular MI-HSM (ver sección de Métodos) con diferentes cantidades de sodio (0.55 – 100.55 mM) a 36 ° C. Para obtener una mejor valoración del contenido de sodio intracelular las células fueron lavadas previamente con MI-HSM. En la figura 6 se muestra un registro de la relación 340 y 380 nm (Relación 340/380) en función de la concentración de sodio externo. El contenido de sodio intracelular en el reposo fue prácticamente el mismo en el rango estudiado (0.55 – 100.55 mM Na), lo cual indica que en medio MI-HSM el espermatozoide tiene una muy baja permeabilidad a este ión. La adición de Gramicidina produjo los incrementos esperados en la relación 340/380, esto es, un aumento notable en la razón 340/380 proporcional al contenido de sodio añadido. A mayor cantidad de sodio el incremento en la señal aumenta proporcionalmente hasta alcanzar aparentemente valores de saturación, como lo indica el hecho de que a 50 y 100 mM Na las señales cambian poco entre sí. En la concentración de 0.55 mM de sodio al adicionar Gramicidina no produjo cambios notables en la señal de la relación 340/380.

La relación 340/380 inducida por la Gramicidina se graficó en función de la concentración de sodio con una serie de cuatro experimentos (n=4), obteniendo como resultado una curva hiperbólica en donde se observa la

presencia de un efecto de saturación a la concentración de 100 mM de sodio externo, ver figura 12.

### **11.1 Calibración de la señal. Obtención de $R_{max}$ , $R_{min}$ , $\beta$ y $K_d$ .**

Para calibrar la señal se obtuvieron valores de  $R_{max}$ ,  $R_{min}$  y  $\beta$  de la ecuación de Grinkievicz deducida en Métodos. El valor de  $\beta$ , esto es, la relación de fluorescencias excitadas a 380 libre sobre unida ( $f_{380_f}/f_{380_b}$ ) se obtuvo experimentalmente a partir de los valores de fluorescencia en medio MI-HSM sin sodio, con el cual obtuvimos  $f_{380_f}$ , y el valor, que se aproxima a saturación. Es importante señalar que la adición de sodio aumenta la fuerza iónica y la osmolaridad del medio, por lo que no es conveniente añadir sodio de manera indiscriminada. En este sentido decidimos dar un valor aproximado de  $f_{380_b}$  tomando como límite máximo el obtenido en medio normal, esto es en medio con 120 mM Na y 8.6 mM KCl. Este valor fue ligeramente superior al obtenido con 100.55 mM de sodio añadido al MI-HSM, lo cual resultó consistente con la idea de la saturación. En estas condiciones el valor aproximado de beta fue  $1.6 \pm 0.02$  ( $n = 4$ ,  $\pm$  error estándar).

Teniendo un valor aproximado de  $\beta$ , se calculó el valor de la  $K_d$  del SBFi por el sodio intracelular en el espermatozoide. El valor de  $R_{min}$  se obtuvo experimentalmente en medio sin sodio ( $R_{min} = 1.035 \pm 0.002$ ,  $n=4$ ,  $\pm$  error estándar) y, con ello, se graficó  $R-R_{min}$  en función de la concentración de sodio. La gráfica resultó en una hipérbola que se muestra en la figura 13.

La forma de Hanes de esta curva, esto es, la gráfica  $Na/R-R_{min}$  vs.  $Na$  (ver figura 14) nos dá, como describimos en Métodos, una línea recta ( $r = 0.999 \pm 7.6 \times 10^{-4}$ ;  $n=4$ ,  $\pm$  error estándar) cuya pendiente es  $1/R_{max}-R_{min}$  e intercepto es  $\beta K_d/R_{max}-R_{min}$ . Es de notar que la línea recta mantiene linealidad a valores por encima de 0.55 mM, en este último punto, el valor obtenido está por debajo de la que predice la teoría. En este sentido los valores alrededor de 0.5 mM de sodio no pudo detectarse con precisión.

El valor de  $R_{max}$  se obtuvo analíticamente de la pendiente de la curva de Hanes y el valor de  $R_{min}$  obtenido experimentalmente, esto es:

$R_{max} = 1/m + R_{min}$ , resultando una  $R_{max} = 1.7 \pm 0.2$  ( $n = 4$ ,  $\pm$  error estándar).

Por otro lado, el valor del intercepto ( $itcp = 40.25$ ) y el valor obtenido de beta ( $\beta = 1.6 \pm 0.02$ ;  $n=4$ ,  $\pm$  error estándar) experimentalmente dan una  $Kd = itcp (R_{max}-R_{min})/\beta = 15.29 \pm 2.87$  mM ( $n=4$ ,  $\pm$  error estándar).

### **11.2 Análisis de la gráfica de Lineweaver-Burk**

La gráfica de dobles recíprocas también se usó para la obtención de  $R_{max}$  y  $Kd$  (ver Métodos). La gráfica de  $1/R-R_{min}$  vs  $1/Na$  da la línea recta ( $r = 0.999 \pm 2.38 \times 10^{-5}$ ;  $n=4$ ,  $\pm$  error estándar) mostrada en la figura 15. La pendiente es igual a  $1/(R_{max}-R_{min})$  y el intercepto es  $\beta Kd / (R_{max}-R_{min})$ . Los valores obtenidos de  $Kd$  y  $R_{max}$  son notablemente cercanos al obtenido en la ecuación de Hanes (tabla 1), sin embargo, es evidente que en la ecuación de Hanes se ponderan mejor todos los puntos en todas las concentraciones de sodio e inclusive podemos apreciar la desviación a la linealidad a muy bajo sodio (ver figura 14), en tanto que en el de Lineweaver-Burk se apilan datos a valores relativamente altos de concentración de sodio como se observa en la figura 15. También es de notar que el valor bajo (el valor de  $1/R-R_{min}$  obtenido a 0.55 mM Na), esto es, el que se aleja demasiado de los valores apilados obtenidos a mayor concentración de sodio, tiene una mucha mayor dispersión (error estándar) de la media comparado con el mismo dato analizado en base a gráficas de Hanes (comparar figuras 14 y 15), hecho relacionado a una baja de

resolución del método a 0.55 mM Na y que en la gráfica de Hanes se apreció como una desviación a la linealidad. En este sentido se prefiere la ecuación de Hanes para la obtención de la constante Kd dada la relativa distorsión que presenta en análisis de Lineweaver-Burk.

### **11.3 Contenido de sodio intracelular en el reposo en el espermatozoide humano**

El contenido de sodio intracelular en el reposo fue de  $6.57 \pm 0.77$  mM (n=4,  $\pm$  error estandar). Este valor es notoriamente menor que el obtenido por Patrat y cols, de 17 mM (18). Estos autores no describen el procedimiento usado para analizar las curvas de calibración con gramicidina y tampoco reportan una Kd. Se considera que el valor encontrado en este trabajo es más exacto y además cabe notar que cae entre los valores estimados para otras células, de 5 a 15 mM (39), pues se detallan con mayor precisión el análisis de los datos.

**11.4 Efecto de la remoción de calcio extracelular en el contenido de sodio intracelular en el espermatozoide.**

Un trabajo reciente, hecho en el laboratorio, ha mostrado que la remoción de calcio con EGTA produce una despolarización dependiente de sodio que es acompañado de una disminución del calcio intracelular (14). El segundo objetivo de este trabajo de tesis, después de detectar y cuantificar el contenido de sodio en el espermatozoide humano, fue estudiar si la despolarización dependiente de sodio refleja cambios en la concentración de sodio intracelular. En la figura 16 se muestra el efecto de la remoción de calcio con EGTA, y la subsecuente restauración de calcio en la señal calibrada de SBFI.

La figura 16 muestra el efecto de disminuir el calcio extracelular, de 2.5 mM a 129 nM con el EGTA, sobre el contenido de sodio en el espermatozoide humano. En este experimento, la quelación de calcio produjo un lento incremento en el sodio intracelular de  $6.57 \pm 0.77$  mM ( $n=4$ ,  $\pm$  error estándar) a 35 mM en dos minutos. En promedio, este efecto fue de  $6.57 \pm 0.77$  mM a  $16.97 \pm 5.4$  mM ( $n=4$ ,  $\pm$  error estándar). La reposición de calcio al medio, detuvo aumento en el sodio intracelular y causó una muy lenta disminución de sodio, que no llegó a valores de reposo (hasta después de 10 minutos de exposición, no mostrado en la gráfica). El experimento se hizo en medio con bajo contenido de sodio, en el que se sustituyó 117.5 mM NaCl por 117.5 mM

Colina Cl. En este medio, la quelación de calcio no produjo aumentos en el sodio intracelular. Esto indicó que en medio con sodio la quelación de calcio produce un influjo de sodio del medio externo.

El influjo de sodio inducido por remoción de calcio del medio extracelular es consistente con la despolarización dependiente de sodio (figura 8), aun cuando la despolarización es muy rápida comparada con el influjo de sodio. Esto en realidad es de esperar, ya que los movimientos de carga se detectan, vía cambios de potencial de membrana, mucho más rápidamente que los movimientos de masa, es decir, la carga detectada durante la despolarización representa muy poca masa transferida (21). Por otra parte, la hiperpolarización inducida por reposición de calcio (ver figura 8) se asoció a cambios mínimos en el elevado contenido de sodio. Este hecho fue inconsistente con la hipótesis planteada, ya que de alguna manera esperábamos que el contenido de sodio intracelular se recobrar a niveles basales en el tiempo de transcurso de la hiperpolarización (ver figura 8 y planteamiento de hipótesis). Si bien no se cumplió con esta parte de la hipótesis, consideramos que el hecho de que no se recobren los niveles de sodio no necesariamente contradice el modelo de la figura 8 de acuerdo a los siguientes argumentos.

Dado que la hiperpolarización depende de la actividad de la ATP- Na,K se podría especular que el intercambio electrogénico de esta bomba es enteramente responsable de la hiperpolarización y en el mismo sentido la transferencia de carga asociada a la hiperpolarización (saca  $3\text{Na}^+$  y mete  $2\text{K}^+$ ) se asocia a una muy pequeña transferencia de masa sodio hacia fuera de la célula. Ahora bien, ¿Por qué la transferencia de masa sodio hacia adentro durante la despolarización dependiente de sodio es mayor que la transferencia de sodio hacia afuera durante la hiperpolarización?. Seguramente esto se debe que la despolarización se da por la apertura de un canal de sodio (el canal de calcio convertido a sodio por ausencia de calcio externo, ver figura 4) que transporta 10 mil veces más iones comparada con la eficiencia de la bomba Na,K, responsable de la hiperpolarización. Consistentemente, mientras que la despolarización vía canal de sodio impacta el contenido de sodio intracelular porque se transporta sodio en grandes cantidades, la extrusión de sodio de adentro de la célula por la ATPasa Na-K no impacta el contenido de sodio intracelular porque su mecanismo de transporte es quizás 10 000 veces más lento que el del canal.

Finalmente, es importante señalar que en los experimentos hechos con MI-HSM para calibrar la señal el contenido de sodio intracelular fue el mismo a diferentes concentraciones de sodio externo (figura 11) a pesar de que el medio MI-HSM no contuvo calcio. Este resultado es contradictorio con los

resultados descritos en las figuras 16 y 17, en los que la remoción de calcio del medio produce incrementos en el sodio intracelular. Es probable que esto se deba a que la membrana estaría muy despolarizada, a valores cercanos a 0 mV, en estas condiciones por la alta concentración de potasio de el medio MI-HSM (120 mM). Esto sugiere que a 0 mV la remoción de calcio no causaría despolarización dependiente de sodio ni decremento en el calcio intracelular en el reposo. A futuro se tendrá que evaluar esta hipótesis.

## **12. CONCLUSIONES**

1.- El método para detectar y cuantificar el sodio intracelular con el SBFI es factible en el espermatozoide humano. El valor de  $K_d$  por sodio intracelular en estas células por análisis de curvas de Hanes está alrededor de 16 mM, que es un valor cercano al obtenido en otros sistemas.

2.- En medio normal la concentración de sodio intracelular está alrededor de 6 mM. La remoción de calcio externo a niveles nanomolares eleva en el sodio intracelular a alrededor de 16 mM en dos minutos. Este incremento se detiene y tiende a revertirse ligeramente al restaurar el calcio en el medio.

3.- La remoción de calcio en medio con bajo sodio extracelular no produce aumentos en el sodio intracelular indicando que en medio con sodio la remoción de calcio externo produce un influjo de sodio.

4.- Los resultados apoyan la hipótesis de que la remoción de calcio externo cambia la selectividad de un canal de calcio a canal de sodio produciendo despolarización. La despolarización dependiente de sodio produce incrementos en el contenido de sodio intracelular que activaría una ATPasa Na,K como mecanismo homeostático de control de sodio intracelular.

### **13. PERSPECTIVAS**

Este estudio demuestra que la despolarización dependiente de sodio inducida por remoción de calcio externo se acompaña de un incremento en el sodio intracelular. Este dato fundamenta la posible activación de la actividad de la ATPasa, Na, K que predice la interpretación mecanística de la figura 4 y 5. Se requieren experimentos de medición directa de la actividad de la bomba en estas condiciones para sustentar con mayor solidez este modelo.

La interpretación de las figuras 4 Y 5 indican que la despolarización dependiente de sodio se presenta por la activación de un canal iónico de calcio que se convierte en sodio al quitar el calcio externo y que, en medio con calcio, funcionaría como una vía de permeabilidad entrante para establecer el contenido de calcio intracelular en el reposo. Hace falta estudiar las propiedades farmacológicas de este sistema que ayuden a identificarlo. Será necesario emplear una batería de bloqueadores de canales de sodio y calcio para identificar el sistema y ver en que medida altera la despolarización, los niveles de calcio basal y, de acuerdo a la contribución de esta tesis, los niveles de sodio intracelular en medio sin calcio.

Finalmente, es necesario recordar que la capacitación del espermatozoide es esencial para la fecundación. La capacitación viene acompañada de un ligero incremento en los niveles de calcio intracelular en el reposo, que se cree que es esencial para que esta ocurra. Pensamos que se requiere una valoración del sistema de flujo de sodio (detectado en esta tesis) y la despolarización dependiente de sodio, durante la capacitación, ya que podría ser un índice que refleje la permeabilidad a calcio en condiciones basales. Pensamos que esto contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de la capacitación en el espermatozoide de mamífero.

**14. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ganong W. Fisiología Médica. 19ª ed., Ed. Maual Moderno, México, 2004, pág. 462-466
2. Fox S. Fisiología Humana. Ed. Mc Graw Hill, España, 2003, pág. 668-671
3. Pocock G. Richards C. Fisiología Humana. La base de la Medicina. Ed. Masson, Barcelona, 2002, pág. 443-448
4. Ho. H. C., Suarez S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa. Function and regulation. *Reproduction*. 2001; 122: 519 – 526.
5. Yanimachi R. Mammalian Fertilization, en: E. Knobil, J. Neil (Eds.). *The physiology of Reproduction*. 2ª ed., Ed. Raven Press, New York, 1994 pág.189 – 217.
6. Yanimachi R., Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Ex. Cell. Res.* 1974; 89: 161 – 174.
7. Moore K. L. *Embriología Clínica*. 3a. ed. México: Editorial Nueva Interamericana; 1985.
8. Baldi E., Casano C., Falsetti C., Rausz C., Maggi M., Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 1991; 12: 323 – 33.
9. Blackmore P. F. Thpsigagin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. 1993; 14: 53 – 60.
10. Mendoza C., Tesarik J. A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett.* 1993; 330: 57 – 60.

11. Hernandez-Gonzalez E., Mornet D, Rendon A, Martinez-Rojas D. Absence of Dp71 in mdx3cv mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. *J Cell Sci.* 2005,118:137-45.
12. Darszon A., Beltrán C., Felix R., Nishigaki t., and Treviño C. Ion transpot in sperm signaling. *Developmental Biology.* 2001; 340: 1 – 14.
13. García M. A., Meizel S.Regulation of intracellular pH in capacited human spermatozoa by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> excahenger. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 52: 189 – 195 .
14. Carbone E., Lux H. D., CarabelliV. Aicardi G. Y Zucker H. Na intern in human sperm 1997; 504: 1 – 21.
15. Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction *Physiol. Rev.* 2002; 82: 429 – 447.
16. Wennemuth G, Babcock DF, Hille B. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm.*J Gen Physiol.* 2003; 122:115-28
17. Foresta C. Rossato F., DiVirgilio F. Involvement of osmo-sensitive calcium influx in human sperm activation *J. Bio. Chem.* 1993; 294: 279 – 283.
18. Guzmán-Grenfell A. M., Bonilla-Hernández M. A., González-Martínez M. T. *Biochem Biophy. Acta.* 2000; 1464: 188 – 198
19. Espinoza F., Darszon A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca<sup>2+</sup>*FEBS Lett.* 1995; 372: 119 – 125.
20. González-Martínez M. T. Induction of a sodium-dependent by external calcium removal in human sperm. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:36304 – 36310.
21. Hille B. *Ion Channels of excitable membranes.* 3<sup>a</sup> ed., Sunderlan Mass Sinauer, 2001.
22. Diarra A., Sheldon C., Church Jhon. In situ calibration and [H<sup>+</sup>] sensivity of the fluorescent Na<sup>+</sup> indicator SBFI. *American Journal Physiology. Cell Physiology.* 2001; 280: 1623 – 1633.

23. Rodríguez E., Darszon A. Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Journal Physiology*. 2002; 546: 89 – 100.
24. Patrat C., Serres C., Jouannet P. Induction of sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 2000; 62: 1380 – 1386.
25. OMS. Manual de laboratorio para la examinación de semen humano y de interacciones semen-mucus cervical. 2ª ed., Ed. Panamericana. 1987, pág. 9 – 77.
26. Blasto L. Clinical test of sperm fertilizing ability and sterility. 1984, 41:177-191.
27. Pérez M. Composición y estudio del semen. En: Padrón RS. Temas de reproducción masculina y diferenciación sexual. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1990, pág. 36-47.
28. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:325-44.
29. Suarez S. S., Wolf D. P., Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res*. 1986; 14: 107 – 121.
30. Sampieri Roberto. Metodología de la investigación. 3ª ed., Ed. Mc Graw Hill, México, 2003, pág. 504-508, 534-535.
31. Haungland Richard. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 5ª ed., Ed. Molecular Probes, INC, U. S. A. 1992 – 1994 pág. 142 – 143, 150.
32. Grynkiewics G, Poenie M., Roger Y. A new generation of Ca<sup>+2</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol. Chem.*1985; 260: 3440 – 3450.
33. Kiedrowski L., Wroblewski J. T. y Costa E. Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol. Pharmacol*. 1994; 45: 1050 – 1054.

34. Levi A. J., Lee C. O. y Brooksby P. Properties of the fluorescent sodium indicator SBFI in rat and rabbit cardiac myocytes. *J. Cardiovasc Electrophysiol.* 1994; 5: 241 – 257.
35. Maier L. S., Pieske B, y Allen D. G. Influence of stimulation frequency on  $[Na^+]_i$  and contractile function in rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 1997; 273: H1246 – H1254.
36. Negulescu P. A. y Machen T. E. Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods Enzymol.* 1990; 192: 38 – 81.
37. Nett W. y Deitmer J. W. Intracellular  $Ca^{2+}$  regulation by the leech glial cell. *J. Physiol.* 1998; 507: 147 – 162.
38. Rose C. R. y Ransom B. R. Regulation of intracellular sodium cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 1997; 499: 573 – 587.
39. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff. *Biología molecular de la célula.* 3ª ed., Barcelona, Ed. Ediciones Omega, 2002, pág. 301.