

Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo

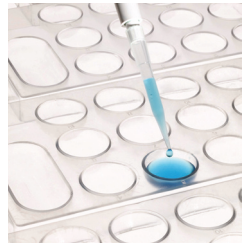
Alberto Darszon

El espermatozoide y el óvulo tienen que dialogar para que ocurra la fecundación, quizá el evento biológico más importante en las especies con reproducción sexual. La posibilidad de recombinación genética y la probabilidad de que las especies subsistan en el tiempo dependen del éxito de esta comunicación. La forma en la que estas dos células, o gametos, influye una sobre la otra, regulando cómo los iones atraviesan su membrana plasmática, es parte clave de su lenguaje. Entre las moléculas de la membrana que permiten el flujo de los iones a través de la membrana tenemos a los *canales iónicos*. La regulación de estos canales influye sobre cómo nada el espermatozoide y sobre los cambios de forma que le deben ocurrir para fusionarse con el óvulo y fecundarlo. Estos cambios se conocen como *reacción acrosomal (RA)*. Los canales iónicos son proteínas membranales que forman un poro a través del cual los iones atraviesan las membranas de manera regulada y con gran eficiencia ($\sim 10^7$ iones/seg).

Entre los organismos de fecundación externa que liberan sus espermatozoides y óvulos al medio ambiente tenemos al erizo de mar. En cambio, en la fecundación interna los espermatozoides se eyaculan dentro del tracto genital femenino, como en los mamíferos. El interior

del tracto genital femenino es mucho más complejo que el agua de mar. Es menos probable que en la fecundación externa se encuentren los gametos (a causa de la enorme dilución) que en la interna. Debido a esto, distintos tipos de organismos producen cantidades diferentes de gametos. Un erizo macho genera alrededor de 10^{10} espermatozoides y una hembra varios millones de óvulos. En cambio, el hombre produce $\sim 10^8$ espermatozoides y la mujer sólo unos cuantos óvulos al mes. Estos números no cambian significativamente entre los mamíferos. Por lo anterior se entiende por qué el erizo de mar es uno de los organismos preferidos para el estudio de la fecundación. Su enorme producción de gametos permite aislar sus componentes celulares y caracterizarlos bioquímica y funcionalmente. Además, este proceso ocurre en el mar, un medio fácil de simular.

Es curioso que siendo tan importante el espermatozoide sea tan pequeño y especializado y con una capacidad muy limitada para sintetizar proteínas (**figura 1**). Casi todos sus transportadores iónicos y proteínas se sintetizan durante la diferenciación de las células espermatogénicas, progenitoras del espermatozoide. A este proceso se le llama espermatogénesis.



29

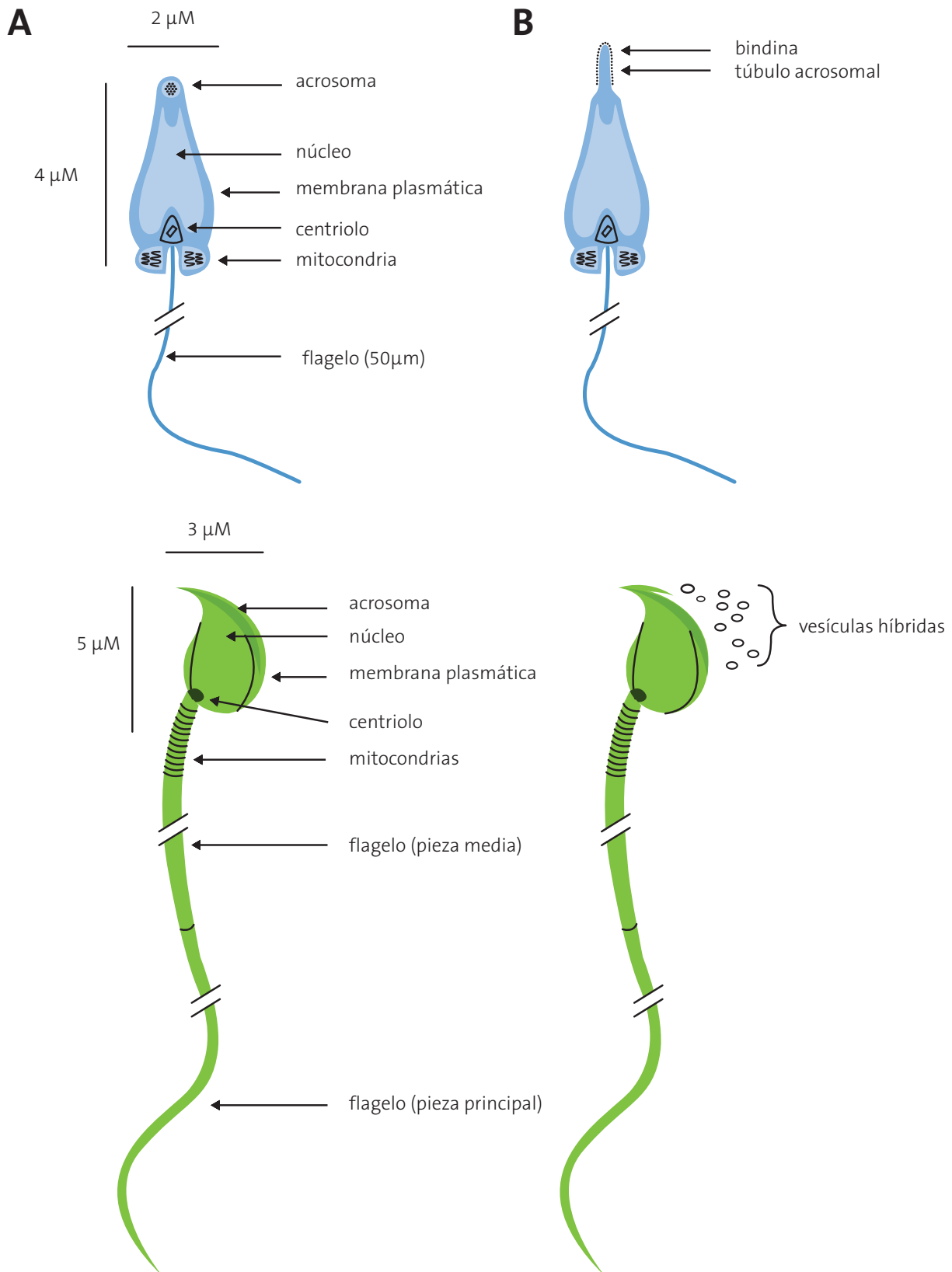


Figura 1. Ilustración del espermatozoide de erizo de mar (arriba) y de ratón (abajo) antes (A) y después (B) de la reacción acrosomal. Se muestran los organelos principales de estas células.

El espermatozoide tiene cabeza y flagelo. Dentro de la cabeza está el núcleo, la vesícula acrosomal y un centriolo. El número y localización de las mitocondrias y la forma de la cabeza depende de la especie (**figura 1**).

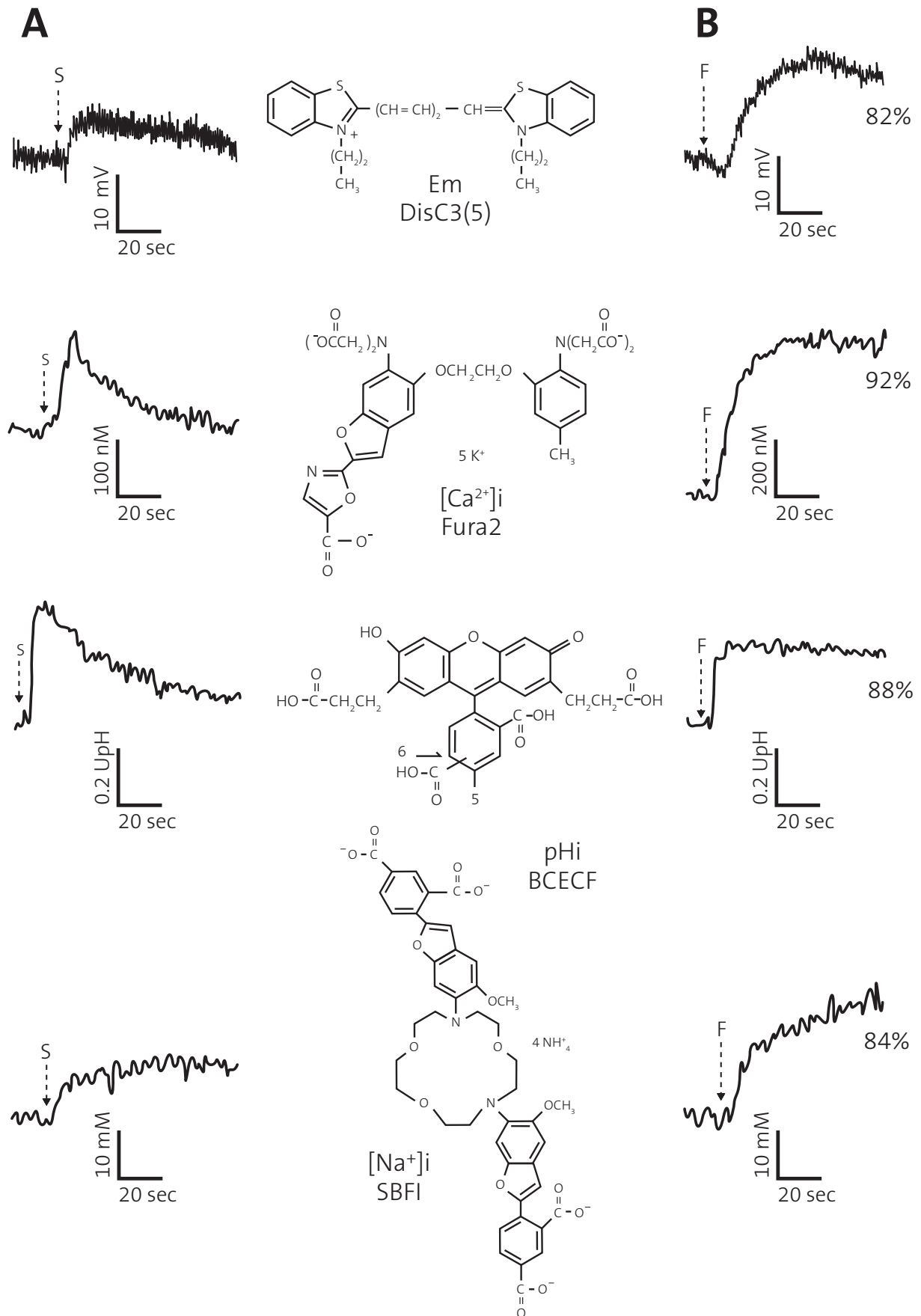
Todas las células poseen canales iónicos; el espermatozoide no es la excepción. Estas proteínas son eficientes catalizadores del paso de 10^7 - 10^8 iones por segundo. Afortunadamente hoy en día existen amplificadores comerciales que pueden medir esta pequeña corriente. Gracias a esto es posible estudiar los cambios estructurales que le ocurren a un solo canal (una proteína) cuando se abre o se cierra. La actividad de estos canales es vital para que las células puedan comunicarse con el mundo externo e interno y entre ellas. Los flujos iónicos a través de membranas en el espermatozoide, particularmente los mediados por canales, regulan su respiración, movilidad y capacidad para fecundar al óvulo. Nuestro grupo registró directamente, por primera vez en el mundo, la actividad unitaria de canales iónicos en el espermatozoide. A lo largo de los años hemos contribuido a constituir un catálogo de los canales iónicos que están presentes en esta importante célula y a entender cómo se regulan e influyen sobre su fisiología (Darszon *et al.*, 2006).

¿Cómo se estudia el movimiento de los iones en el pequeño espermatozoide?

Ha sido difícil usar técnicas electrofisiológicas tradicionales en una célula tan chica y de morfología compleja. Afortunadamente en la última década se desarrollaron moléculas fluorescentes que detectan selectivamente cambios en las concentraciones intracelulares de calcio²⁺ ($[Ca^{2+}]_i$), potencial de hidrógeno (pHi), sodio⁺ ($[Na^+]_i$), potencial eléctrico de membrana (E_m) y otros. El uso de estos colorantes fluorescentes para estudiar los cambios iónicos que ocurren en poblaciones de espermatozoides del erizo de mar en respuesta a los componentes de la capa externa del óvulo se muestra en la **figura 2**. Este tipo de determinaciones son útiles también en el espermatozoide de mamífero (Darszon *et al.*, 2006).

La información que se ha obtenido midiendo flujos iónicos en poblaciones de espermatozoides usando colorantes fluorescentes ha sido muy valiosa. Sin embargo, en estos experimentos no se sabe dónde ocurren los cambios iónicos en la célula, que es fundamental para comprender cómo estos flujos regulan el comportamiento celular. Ahora es posible combinar la microscopía con el uso de los colorantes fluorescentes para medir simultáneamente cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ en un espermatozoide nadando, la forma de su flagelo y su trayectoria. La **figura 3** ilustra cómo logramos realizar estos experimentos por primera vez en el espermatozoide del erizo de mar (Wood *et al.*, 2005).

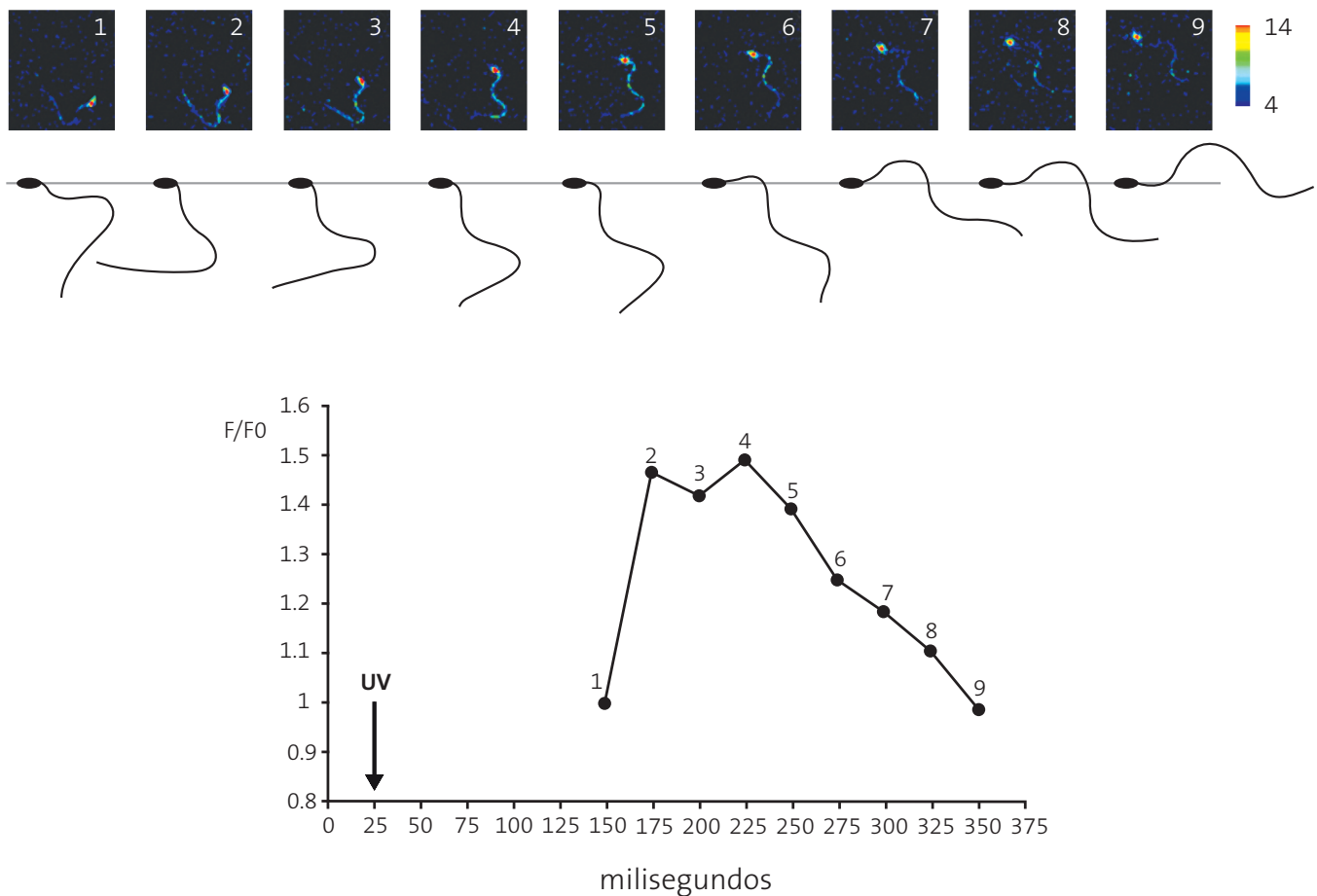
El estudio directo de la participación de canales iónicos en la fisiología de una célula requiere de medidas eléctricas. Nuestros experimentos fueron los primeros en documentar la actividad de canales individuales en el espermatozoide (Darszon *et al.*, 2005). Existen diferentes estrategias para estudiar los canales iónicos del espermatozoide que se ilustran en la **figura 4**. Estas técnicas requieren de la incorporación de componentes de la membrana plasmática del espermatozoide, ya sea directamente de la célula o aisladas con diferente grado de pureza, a membranas modelo planas. Las propiedades básicas de los canales iónicos, tales como la selectividad iónica, la dependencia de voltaje, la regulación por pH, por segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc, GMPc, IP3, etc.) y por el estado de fosforilación, se pueden estudiar detalladamente usando estas estrategias. Incluso en el espermatozoide, que es tan pequeño, hemos podido registrar la actividad de canales iónicos directamente usando espermatozoides de erizo de mar y ratón normales (Guerrero *et al.*, 1986 y Espinoza *et al.*, 1998) o hinchados (Babcock *et al.*, 1992 y Sánchez *et al.*, 2001). En estos experimentos se utilizó una estrategia de electrofisiología llamada "patch-clamp" en la que se usa una pipeta de vidrio con una punta de fracciones de micra que en su interior tiene un electrodo de metal. La pipeta establece un sello de alta resistencia eléctrica y mecánica con la mem-



← Figura 2.

Medición de flujos iónicos usando colorantes fluorescentes. Cambios en el potencial de membrana (E_m), concentración de Ca intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), pH intracelular (pHi) y Na intracelular ($[Na^+]_i$). Respuesta al speract (A) y respuesta al factor (B) que induce la reacción acrosomal en espermatozoides de *S. purpuratus*. Los porcentajes al final de los trazos representan

el % de reacción acrosomal. La flecha indica la adición de 100 nM speract o del factor en todos los trazos. Una deflexión hacia arriba indica un aumento en el parámetro indicado. La estructura de la sonda fluorescente usada se muestra al centro de la figura: Disc3-(5) para E_m , BCECF para pHi, Fura-2 para $[Ca^{2+}]_i$, y SBFI para $[Na^+]_i$.



↑ Figura 3.

Aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la liberación de GMPc en un espermatozoide del erizo de mar *S. purpuratus* nadando. Los espermatozoides tienen en su interior GMPc enjaulado y fluo-4 (un indicador de Ca^{2+}). El GMPc enjaulado se activa disparando un pulso de luz ultravioleta (UV) que induce un aumento en el Ca^{2+} intracelular y en la asimetría del flagelo en un espermatozoide nadando. Los paneles superiores muestran imágenes de fluorescencia del fluo-4 que muestran un aumento en el Ca^{2+} en el flagelo, después de la aplicación de un pulso de luz UV. Debajo de cada imagen, la posición nor-

malizada del espermatozoide muestra que la asimetría del flagelo, con relación al eje largo de la cabeza, aumenta inmediatamente después del inicio del aumento en el Ca^{2+} . El flagelo regresa a un estado más simétrico en las imágenes subsiguientes, aunque el Ca^{2+} sigue elevado. La gráfica muestra el aumento de la fluorescencia como promedio a lo largo del flagelo, y los números corresponden a las imágenes de arriba. F/F0 representa el valor de la fluorescencia del flagelo en cada imagen normalizado con respecto al valor de fluorescencia del flagelo en la primera imagen (después del pulso UV).

brana plasmática celular. Esto permite medir corrientes iónicas muy pequeñas, como las que pasan por un solo canal, o más grandes como las que pasan por el conjunto de canales celulares. Ahora es posible utilizar una nueva estrategia que permite controlar con mayor precisión el sitio en la membrana del cual se pueden registrar canales iónicos individuales, incluso en el espermatozoide (Gorelik *et al.*, 2002). Recientemente se logró medir las corrientes iónicas del ensamble completo de canales del espermatozoide de ratón inmaduro. Este importante avance se logró haciendo “patch-clamp” en la gota citoplásmica que muestran estos espermatozoides. Esta gota se genera durante la maduración del espermatozoide y sirve para eliminar componentes celulares que el espermatozoide maduro ya no necesitará (Kirichok *et al.*, 2006 y Darszon *et al.*, 2006).

Además de que el espermatozoide es diminuto y difícil de estudiar electrofisiológicamente, en este momento no es claro si pueda sintetizar algunas proteínas. En cambio, las células espermatogénicas que dan lugar al espermatozoide maduro son más grandes y sintetizan proteínas. Usando estas células en el ratón, hemos podido hacer registros electrofisiológicos más fácilmente (figura 4F) y además utilizar por primera vez técnicas de biología molecular para determinar los ARN mensajeros que codifican a los canales iónicos presentes en los diferentes estadios de la espermatogénesis (Liévano *et al.*, 1996 y Darszon *et al.*, 2006). Hemos documentado mensajeros en las células espermatogénicas de ratón y la expresión de proteínas, tanto en estas células como en el espermatozoide maduro, para los siguientes canales: receptor de ryanodina (RyR), receptor de IP3 (RIP3), las subunidades α y β de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Cav), los 7 genes homólogos a *trp* de *Drosophila*, y las proteínas TRP 1, 3 y 6. La distribución de estos canales a lo largo del espermatozoide es heterogénea, lo que sugiere que tienen funciones particulares. También hemos caracterizado detalladamente las corrientes de los Cav de tipo T (bajo umbral

de activación) en las células espermatogénicas (figura 4F) y ahora en el espermatozoide testicular. Por otra parte, estamos estudiando canales de K^+ , de Na^+ y Cl^- tanto en células espermatogénicas de ratón como en el espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006).

Participación de canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar en la movilidad y la reacción acrosomal

Una propiedad fundamental de algunas células es la movilidad. Las células eucariontes se impulsan gracias a cilios y flagelos, cuya estructura es muy conservada. El flagelo del espermatozoide le permite nadar y cumplir con su principal cometido: fecundar al ovocito e introducir en él su material genético. El movimiento flagelar lo genera el *axonema*, un complejo aparato formado por cientos de proteínas, entre ellas las tubulinas y las dinein-ATPasas. El batido flagelar y por ende la movilidad están regulados finamente por la composición del medio y especialmente por el Ca^{2+} .

La alta tensión de CO_2 en el semen mantiene el pH del espermatozoide a ~ 7.2 , impidiendo que naden los espermatozoides del erizo de mar dentro del testículo. La energía para mover el flagelo proviene del ATP que hidroliza la dineína, una ATPasa que es inactiva a este pH. La concentración de CO_2 disminuye cuando se liberan los espermatozoides al agua de mar; entonces se alcaliniza el pH y se activa la dineína. La respiración mitocondrial y la movilidad del espermatozoide aumentan al elevarse el ADP.

En la capa que rodea al óvulo, llamada *gelatina*, existen pequeños péptidos que modulan la movilidad del espermatozoide. Cuando esta modulación aumenta el número de espermatozoides cerca del óvulo, se le conoce como *quimotaxis*. En la especie *Arbacia punctulata* del erizo se ha demostrado que muy bajas concentraciones ($<10^{-9}$ M, millonésimos de gramo por litro) de un dodecapéptido de la gelatina del óvulo llamado *resact* es quimotáctico. Varios organismos marinos usan esta estrategia para lidiar con el problema de dilución que ocurre

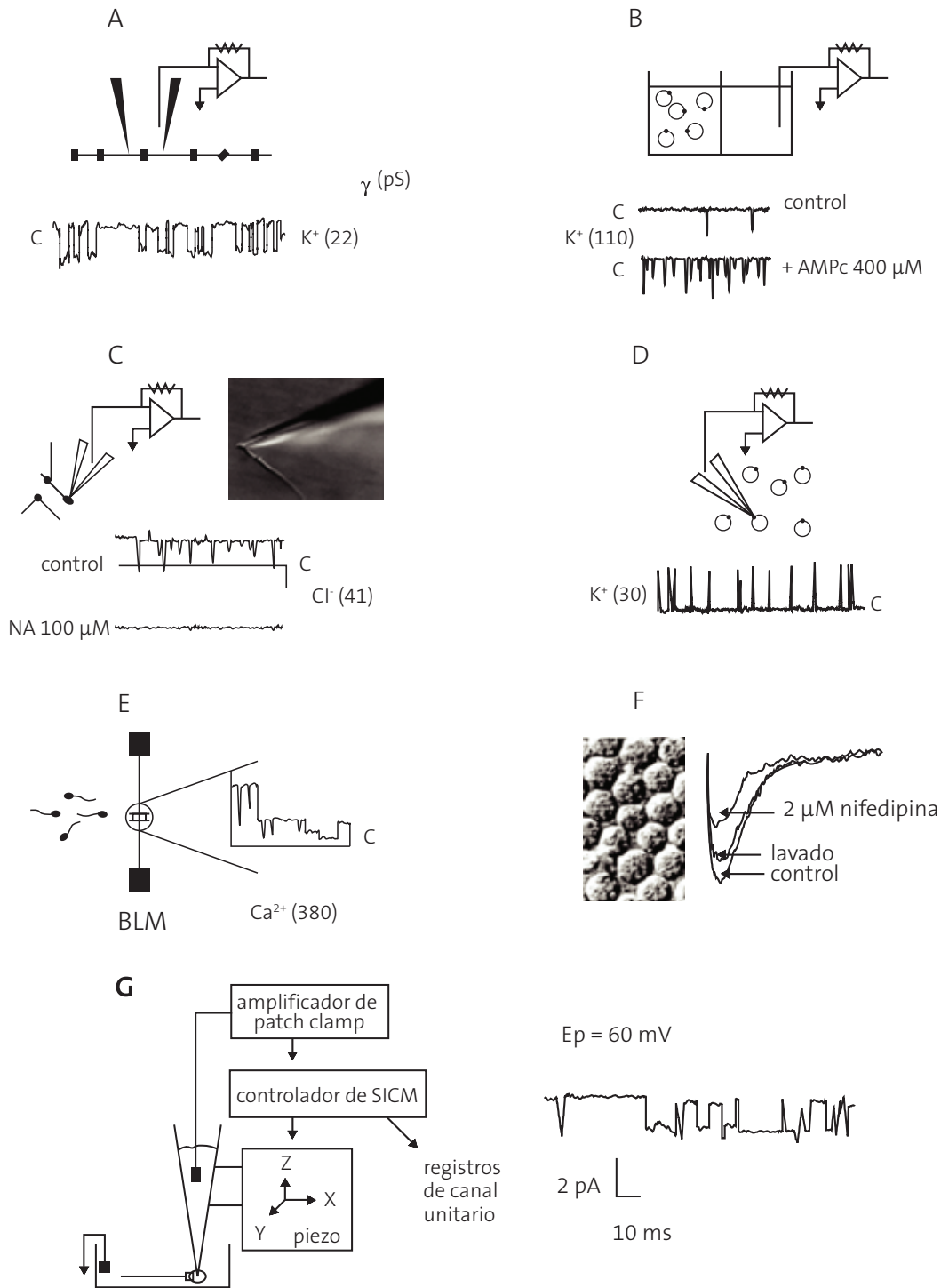


Figura 4.

¿Cómo se mide directamente la actividad de los canales iónicos del espermatozoide? Se muestran los registros de los canales detectados con diferentes estrategias. Se indica el ión que se transporta principalmente. (A) Bicapas en la punta de una pipeta de “patch-clamp”. En todas las figuras “C” indica el nivel cerrado del canal. (B) Membranas lipídicas negras. Se fusionan vesículas de membrana plasmática de espermatozoides a una bicapa lipídica plana. Se muestran fluctuaciones esporádicas control entre el estado cerrado y el abierto de un canal catiónico activado por hiperpolarización. La parte inferior muestra la activación por AMPc.

(C) Registros de “patch-clamp” en la configuración de célula unida en espermatozoides completos de ratón. Se ilustra el trazo control y el bloqueo de un canal aniónico por ácido níflúmico (NA). (D) Registros de “patch-clamp” en espermatozoides de erizo de mar osmóticamente hinchados. (E) Transferencia directa de canales del espermatozoide completo a bicapas planas. (F) Registros de corrientes (derecha) de Ca^{2+} tipo T en células espermatogénicas de ratón (izquierda). Se muestra la corriente obtenida por un pulso de -90 mV a -20 mV y como ésta se bloquea reversiblemente con nifedipina. (G) “Smart patch”.

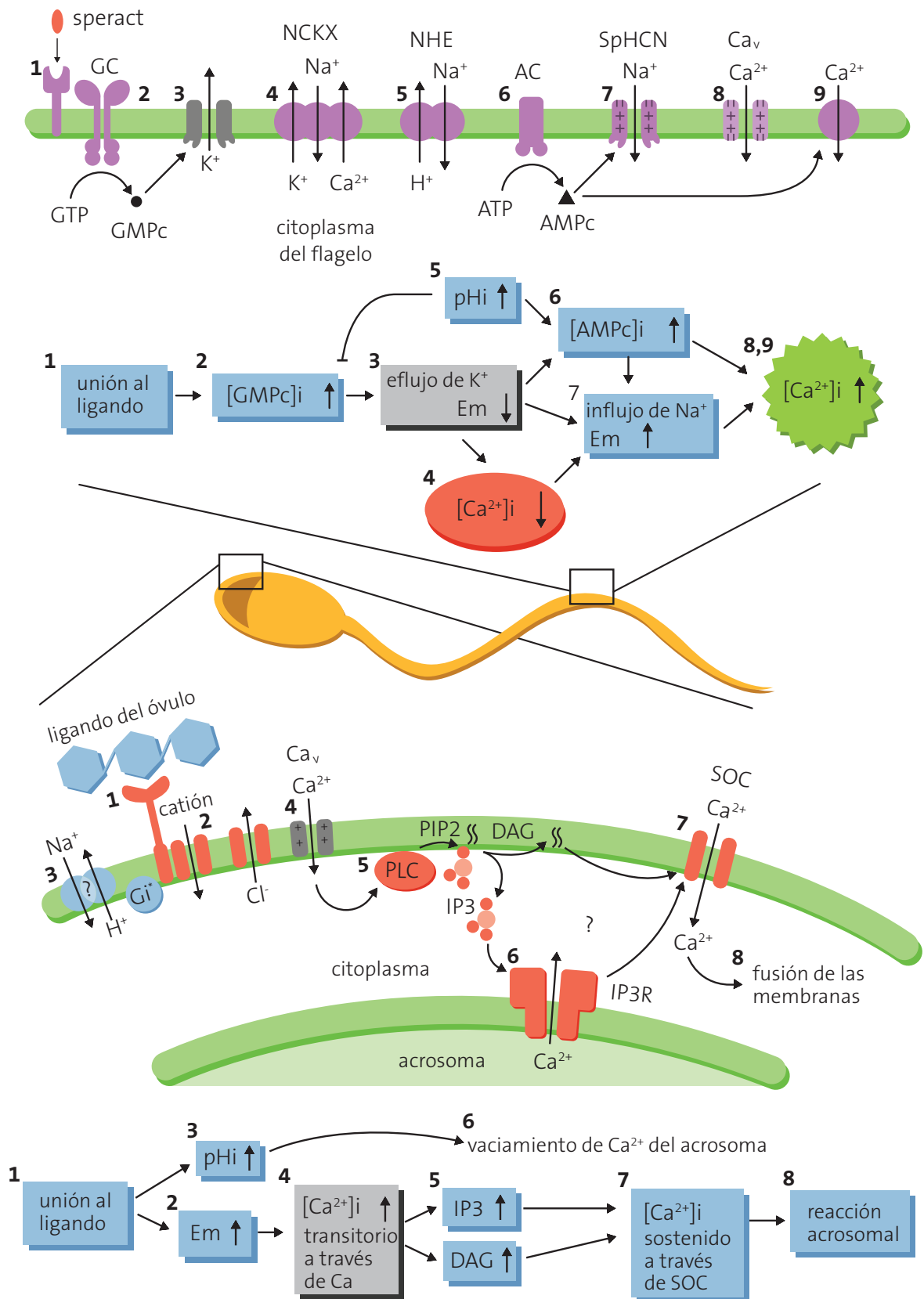


Figura 5.

Arriba. Esquema de las vías de señalización inducidas por el speract en el erizo de mar de *S. purpuratus*. (1) Al unirse el speract a su receptor activa una guanilato ciclasa (GC, 2) que aumenta el GMPc, lo cual promueve el flujo de K^+ a través de un canal de K^+ dependiente de GMPc (3) que vuelve al potencial de membrana del espermatozoide (E_m) más negativo. Esta hiperpolarización activa al intercambiador Na^+/Ca^{2+} (4), Na^+/H^+ (5), a la adenilato ciclasa (AC, 6) y a un canal activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos llamado SpHCN (7), esto da como resultado la alcalinización intracelular, la elevación del AMPc, y a un influjo de Na^+ (despolarización del E_m). La despolarización activa a un canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente (8). El aumento en el AMPc puede estimular a una canal de Ca^{2+} aún no identificado (9). También, el aumento en el $[Na^+]_i$ y la despolarización podrían revertir el intercambio Na^+/Ca^{2+} . Algunas fosfatasa y fosfodiesterasas pueden ser sensibles al pHi reduciendo rápidamente los niveles de GMPc. Abajo. La reacción acrosomal en espermatozoide de erizo de mar y de ratón. En ambas especies, la unión del ligando (el factor para erizo y la ZP3 para ratón) a su receptor (1) induce aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ (2) y alcalinización (4). Estos cambios son indispensables para el subsecuente incremento sostenido de $[Ca^{2+}]_i$ (7), el cual es una señal fundamental para que ocurra la reacción acrosomal. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ a

través de canales voltaje dependientes podría estimular a la fosfolipasa C (PLC, 5) y así producirse 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). La salida de Ca^{2+} a través de los receptores de IP3 (6), vacía la poza interna de Ca^{2+} (probablemente el acrosoma), conduciendo a la activación de canales de Ca^{2+} operados por pozas internas (SOC, 7) en la membrana plasmática. El incremento en el pHi puede de manera directa o indirecta (i. e. aumentando la afinidad del receptor por el IP3) incrementar la actividad de los canales SOC. El mecanismo detallado de las dos especies muestra diferencias. En erizo de mar, la unión del factor a su receptor (REJ) activa un canal de Ca^{2+} sensible a dihidropiridinas (2) y transitoriamente a un canal de K^+ sensible a TEA por mecanismos desconocidos. Posiblemente, REJ mismo tenga actividad de canal. La hiperpolarización que resulta de la salida de K^+ estimula al intercambio Na^+/H^+ dependiente de potencial y de Ca^{2+} , incrementando así el pHi. El incremento en el AMPc podría regular varios canales. En ratón, es probable que existan varios receptores a la ZP3. Uno de ellos (quizá PKDREJ) podría activar un canal catiónico y aumentar el E_m activando un canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo T (2). Otro receptor candidato es la α -galactosiltransferasa (GalT), que estaría acoplada a proteínas G (G_i) sensibles a la toxina de pertussis (PTx), controlando el pHi, el intercambio Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ y el eflujo de H^+ .

cuando se liberan los espermatozoides al mar y que estos puedan encontrar al óvulo. La quimiotaxis y la forma en que se mueven los flagelos depende del Ca^{2+} en el agua de mar.

En el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*, el *speract*, un decapeptido de la gelatina de óvulos análogo al *resact*, induce cambios en las concentraciones de segundos mensajeros y en la permeabilidad iónica del espermatozoide. La **figura 5** ilustra nuestra hipótesis de trabajo sobre estos cambios (parecidos a los producidos por el *resact*):

1. Se activa transitoriamente una guanilato ciclasa que aumenta temporalmente la concentración de GMPc.
2. La elevación del GMPc activa un canal selectivo para K^+ que hace más negativa a la célula, la hiperpolariza.
3. La hiperpolarización estimula un intercambio de Na^+ por H^+ a través de la membrana plasmática, aumenta el pH_i y activa intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ disminuyendo el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta hiperpolarización también estimula a una adenilato ciclasa, elevando los niveles de AMPc.
4. La hiperpolarización y el aumento de AMPc activan un canal iónico del espermatozoide llamado SpHCN de la familia HCN que depolarizaría a la célula.
5. Seguramente otros canales participan en la repolarización y depolarización del Em que estimula Cav, aumentando transitoriamente el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Existe al menos un canal de Ca^{2+} regulado por AMPc y posiblemente canales de Cl^- que modulan esta respuesta (Darszon *et al.*, 2006).

Recientemente demostramos que los espermatozoides de *S. purpuratus* cambian su forma de nadar cuando aumenta el GMPc debido a un aumento transitorio en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que posiblemente ocurre a través de canales Cav (Wood *et al.*, 2005). Unos meses después, otro grupo alemán reportó cambios parecidos en *A. punctulata* disparados por *resact* y GMPc (Bohmer *et al.*, 2005). Ahora nosotros hemos registrado cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la movilidad en respuesta al *speract* que documentan

la relación entre las vías específicas por las que entra el Ca^{2+} y la respuesta del flagelo (observaciones de C. Wood *et al.*, remitidas para su publicación). Ambos grupos coincidimos en que la regulación local del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es la que gobierna la movilidad del espermatozoide aumentando la probabilidad de que éste encuentre al óvulo y pueda fecundarlo.

La reacción acrosomal. La vesícula acrosomal, que se encuentra en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, se deriva del aparato de Golgi. Esta vesícula contiene las enzimas necesarias para penetrar la capa externa del óvulo. La reacción acrosomal (RA) es un proceso en cual la membrana acrosomal y la plasmática se fusionan en múltiples sitios y se liberan las enzimas líticas presentes en el acrosoma. El espermatozoide expone nuevos componentes de membrana requeridos para que se fusione con el óvulo durante este proceso. La RA está orquestada por cambios de permeabilidad iónica que induce la capa externa que rodea al óvulo (Yanagimachi, 1994 y Vacquier, 1998).

Además de péptidos pequeños como el *speract* y el *resact*, la gelatina del óvulo contiene una molécula de alto peso molecular ($>10^6$ KDa) rica en fucosa sulfatada (un polímero de azúcar con grupos sulfato) con poca proteína llamada *factor*. Esta compleja molécula dispara la RA que involucra cambios morfológicos necesarios para que el espermatozoide fecunde al óvulo. El gránulo acrosomal y la membrana plasmática se fusionan durante esta reacción exponiéndose componentes necesarios para que el espermatozoide pueda fusionarse con el óvulo. Segundos después de que el espermatozoide detecta al factor de la gelatina, éste se une a su receptor (suREJ1) y dispara una entrada de Ca^{2+} y Na^+ y una salida de K^+ y H^+ . SuREJ1 es una glicoproteína que se encuentra en la membrana plasmática. Los movimientos iónicos disparados por el factor cambian el Em del espermatozoide, su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y pH_i , y aumentan los niveles de los segundos mensajeros AMPc e IP3 (**figura 5B**). La RA se inhibe con bloqueadores de canales de Ca^{2+} , como el Ni^{2+} , el verapamil y las dihidropiridinas; de K^+ , como el TEA⁺

y aniónicos como DIDS y ácido niflúmico. Estos resultados muestran la importante participación de los canales iónicos en este proceso fundamental para la fecundación (revisado en Darszon *et al.*, 2006).

SuREJ1 se llama así porque tiene un módulo REJ (una secuencia de amino ácidos particular) que está presente en una proteína membranal de las células renales llamada policistina-1. Esta proteína, junto con otra, la policistina-2, forma canales iónicos que influyen sobre la morfología y la función de los túbulos renales. La enfermedad renal autosómica poliquística en la que se forman quistes en el riñón, se debe a mutaciones en estas dos proteínas renales y es médicamente muy importante y frecuente. El espermatozoide del erizo contiene varias isoformas de REJ (Vacquier, 1998 y Darszon *et al.*, 2006).

El speract y el factor inducen cambios de permeabilidad aparentemente parecidos. Sin embargo, bloqueadores de la RA, como el Ni^{2+} y el TEA^+ , inhiben los flujos de Ca^{2+} y H^+ inducidos por el factor, pero no los que produce el speract. El perfil farmacológico de estos cambios indica que hay diferencias en los sistemas de transporte iónico que participan en las respuestas inducidas por estos dos componentes de la gelatina del óvulo (Darszon *et al.*, 2006).

Importancia de los canales iónicos en la capacitación y la RA del espermatozoide de mamífero

La permeabilidad iónica es también esencial para el espermatozoide y para la fecundación en mamíferos y se estudia usando las estrategias descritas en las figuras 2 y 4. Desgraciadamente los espermatozoides de mamífero no son más grandes que los del erizo, por lo que las estrategias experimentales que desarrollamos para estudiar la fisiología del espermatozoide del erizo se deben utilizar en el ratón y el hombre. Afortunadamente, desde hace tiempo existen metodologías para aislar y separar células espermatozoides de mamíferos de acuerdo a su estadio de desarrollo (revisado en Darszon *et al.*, 2005, 2006).

Capacitación. Para poder fecundar al óvulo, los espermatozoides de los mamíferos deben llevar a cabo un proceso de maduración en el tracto reproductor femenino llamado *capacitación*. Esta maduración se ha asociado a la reducción del contenido de colesterol que resulta en una disminución en la rigidez de la membrana plasmática y re-arreglos y/o modificaciones en el contenido de lípidos y proteínas de esta membrana. Adicionalmente aumenta el pH y los niveles de Ca^{2+} , así como la permeabilidad a K^+ y los niveles de segundos mensajeros, como AMPc, IP_3 y diacilglicerol. Estas alteraciones en las propiedades de la membrana plasmática quizá expliquen el aumento en la entrada de Ca^{2+} y HCO_3^- que activan a la adenilato ciclasa. Aparte de activar a la AC, la entrada de HCO_3^- hace más negativo el potencial de membrana (hiperpolarización) del espermatozoide de ratón, dependiendo de la presencia de K^+ y Na^+ en el medio externo, y también contribuye al aumento del pH_i durante la capacitación. Se puede llevar a cabo la capacitación *in vitro*, incubando los espermatozoides en un medio definido que contenga al menos tres elementos claves: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica bovina (BSA) (revisado en Yanagimachi, 1994).

Estudiando electrofisiológicamente las células espermatozoides de ratón, encontramos un canal que deja entrar con mayor facilidad al K^+ que salir. Esta característica es típica de canales de K^+ llamados *rectificadores entrantes*. El pH_i regula a estos canales que se bloquean con iones de bario (Ba^{2+}). Resulta que la presencia de Ba^{2+} mM durante la capacitación previene la hiperpolarización asociada a este proceso e inhibe parcialmente la RA inducida por la ZP. Estos hallazgos indican que canales de K^+ rectificadores entrantes participan en la capacitación del espermatozoide maduro (Muñoz-Garay *et al.*, 2001). Hace poco detectamos, tanto funcionalmente como por sus RNA mensajeros y proteínas, canales rectificadores de K^+ entrantes sensibles a ATP (canales K_{ATP}), tanto en células espermatozoides como en espermatozoides maduros de ratón (Acevedo *et al.*, 2006). Registros de "patch-clamp" en células espermatozoides

nicas de ratón mostraron corrientes de K^+ de rectificadores entrantes sensibles a Ba^{2+} , glucosa y sulfonilureas, como la tolbutamida, que bloquean a los canales K_{ATP} . Es interesante que la tolbutamida inhibe la hiperpolarización asociada a la capacitación y la RA de manera dosis dependiente. Estas observaciones indican que canales K_{ATP} participan en la hiperpolarización y en la capacitación del espermatozoide de ratón. Se piensa que la hiperpolarización que ocurre durante la capacitación es necesaria para que los Cav que participan en la RA cambien de su estado inactivado a su estado cerrado. Esta modificación permitiría que estos canales se pudieran abrir en respuesta a la despolarización inducida por el inductor fisiológico de la RA (Darszon *et al.*, 2006).

Reacción acrosomal. Para que el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide de mamífero pueda fusionarse con el óvulo es necesario que ocurra la RA (Yanagimachi, 1994). La capa externa que rodea al óvulo de los mamíferos llamada *zona pelúcida* (ZP) contiene al inductor fisiológico de la RA del espermatozoide. La ZP está compuesta de tres o cuatro glicoproteínas, entre las que la ZP3 es la responsable de inducir esta reacción. La RA inducida por ZP o ZP3 requiere de Ca^{2+} externo e involucra: incrementos en el $[Ca^{2+}]_i$ mediados por canales, un aumento en el pHi y cambios en el Em. Aún se desconoce cuál(es) es(son) el(los) receptor(es) de ZP3. Se postula que la unión de la ZP a su(s) receptor(es) dispara cambios en el Em que activan a los Cav del espermatozoide maduro, ya que su inactivación se elimina durante la capacitación. Además de estos cambios, la RA inducida por la ZP requiere de un incremento transitorio de pHi, que es sensible a la toxina *pertussis*, un inhibidor de proteínas G. Desconocemos todavía cuál es la relación entre el aumento en el pHi y el $[Ca^{2+}]_i$. Resultados nuestros y de la literatura indican que la calmodulina (CaM), una proteína que une Ca^{2+} y media la función de segundo mensajero de este catión, pudiera participar en la RA. En espermatozoides de erizo de mar y de ratón, inhibidores de la CaM bloquean la RA, la entrada de

Ca^{2+} asociado a esta reacción y la corriente de Ca^{2+} a través de Cav que se registra en células espermátogénicas de ratón. La CaM está presente en la región acrosomal (López-González *et al.*, 2001).

La RA disparada por la ZP en el espermatozoide de ratón conlleva un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ que tiene dos fases. Al menos dos tipos de canales de Ca^{2+} diferentes participan en la RA de esta especie (revisado en Darszon *et al.*, 2006). Inicialmente ocurre una rápida entrada de Ca^{2+} , cuyo perfil farmacológico y temporal semeja al que muestran los Cav tipo T registrados en células espermátogénicas (Liévano *et al.*, 1996). A pesar de la relevancia de la corriente T del espermatozoide en la fecundación, aún se desconoce su identidad molecular, ya que están presentes los tres miembros de esta familia. Nuestros resultados (Treviño *et al.*, 2004) y los del grupo de Arnoult sugieren que $Ca_v3.2$ ($\alpha 1H$) codifica a los canales T del espermatozoide de ratón (revisado en Darszon *et al.*, 2006).

La hipótesis de trabajo más aceptada considera que la inducción de la RA por la ZP estimula la entrada de Ca^{2+} a través de los canales T que activa a una fosfolipasa C presente en el espermatozoide. Al activarse la fosfolipasa C se incrementan los niveles de IP3. El receptor de IP3 está presente en el acrosoma de estas células. Nosotros hemos aportado evidencia de que la elevación de la concentración de IP3 intracelular resulta en el vaciamiento del Ca^{2+} acrosomal, la poza interna en el espermatozoide, lo cual activa al segundo componente del influjo de Ca^{2+} . Este segundo canal tiene propiedades consistentes con las de los canales de Ca^{2+} regulados por pozas internas (capacitativos o SOCs) y parece contribuir significativamente al aumento lento y sostenido del $[Ca^{2+}]_i$ durante la RA. Se considera que alguno de los miembros de la familia de los genes *trp* codifican para este tipo de canales. Nosotros hemos determinado la presencia de los mensajeros y de varias de las proteínas de esta familia en células espermátogénicas y en el espermatozoide maduro de ratón. En el ratón se reportó que el TRP2 está involucrado en la entrada de Ca^{2+} al espermato-

zoide inducida por la ZP, lo cual es consistente con la participación de canales capacitativos en la RA (revisado en Darszon *et al.*, 2006).

Aún tenemos muchas preguntas importantes por resolver para entender cómo el espermatozoide fecunda al óvulo. ¿Cuál es el receptor o receptores a la ZP y cómo la unión de ésta abre a los Cav para iniciar la RA? Los Cav requieren de una despolarización para abrirse, pero ignoramos qué mecanismos de transporte iónico causan esta despolarización, y cómo la ZP los regula. Quizá este cambio de potencial eléctrico ocurra gracias a la apertura de un canal catiónico que contiene una subunidad del tipo REJ inducida por la ZP. Los canales regulados por neurotransmisores, como GABA y glicina, o algún miembro de la nueva familia CatSper, que son específicos del espermatozoide, son otras posibilidades (revisado en Darszon *et al.*, 2006).

Perspectivas

La fecundación es un proceso fundamental para la generación de nuevos individuos que requiere de la participación de canales iónicos. Necesitamos conocer la identidad molecular de los canales iónicos del espermatozoide que modulan su movilidad, maduración y que participan en la RA disparada por los ligandos del óvulo, así como los mecanismos que los regulan. La combinación de nuevas estrategias de genómica y proteómica nos ayudará a resolver estos problemas. Es imperativo, sin embargo, poder estudiar con resolución temporal y espa-

cial la función celular para comprender cómo se orquestan los procesos y cómo se organiza la increíble coreografía necesaria para que los participantes moleculares del espermatozoide le permitan encontrar al óvulo, fusionarse con él y activarlo. Las nuevas herramientas de la microscopía de fluorescencia, junto con novedosos enfoques electrofisiológicos, comienzan a revelarnos dónde y cuándo ocurren los cambios iónicos y de segundos mensajeros dentro de la célula que se requieren para que ésta viva y se reproduzca. ●

Agradecimientos

Esta investigación recibió apoyo de CONACyT, DGAPA, Wellcome Trust y NIH/FIRCA (RO3 TW 006121). El trabajo que aquí se resume no se habría realizado sin la participación de mis estudiantes y particularmente de los miembros de mi grupo.

Estudiantes: Felipe de Jesús Espinosa Becerra, Blanca Estela Galindo Barraza, Carmen Serrano Escobedo, Roberto Carlos Muñoz Garay, Daniel Sánchez, Ignacio López González, Esmeralda Rodríguez Miranda, Gabriel Alberto Gasque Miranda, Laura Edith Castellano Torres, Gisela Granados González.

Colaboradores: Arturo Liévano, Carmen Beltrán, Claudia Treviño, Takuya Nishigaki, Christopher Wood, Ricardo Félix, Arturo Hernández, Juan José Acevedo e Irene Mendoza Lujambio.

Técnicos: José Luis de la Vega, Juan Monroy Mendoza, Francisca Candelaria García.

Bibliografía

- Acevedo, J. J. *et al.*, "K_{ATP} channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation", en *Dev. Biol.*, núm. 289, 2006.
- Babcock, D. F. *et al.*, "Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract", en *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 89, 1992.
- Bohmer, M. *et al.*, "UB. Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm", en *Embo. J.*, vol. 24, 2005.
- Darszon, A. *et al.*, "Sperm channel diversity and functional multiplicity", en *Reproduction* vol. 131, 2006.
- _____, "T-type Ca²⁺ channels in sperm function", en *Cell Calcium*, núm. 40, 2006a.
- Espinosa, F. *et al.*, "Mouse sperm patch-clamp recording reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction", en *FEBS Letters*, núm. 426, 1998.
- Gorelik, J. *et al.*, "Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a mini patch-clamp system", en *Biophys. J.*, vol. 83, 2002.
- Guerrero, A., J. A. Sánchez y A. Darszon, "Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique", en *FEBS Letters*, núm. 220, 1987.
- Kirichok, Y., B. Navarro y D. E. Clapham, "Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel", en *Nature*, núm. 439, 2006.
- Liévano, A., J. A. Sánchez y A. Darszon, "Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode", en *Dev. Biol.*, núm. 112, 1985.
- López-González, I. *et al.*, "Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca²⁺ currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction", en *Dev. Biol.*, núm. 236, 2001.
- Muñoz-Garay, C. *et al.*, "Inwardly rectifying K⁺ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation", en *Dev. Biol.*, núm. 234, 2001.
- Sánchez, D., P. Labarca y A. Darszon, "Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by camp", en *FEBS Letters*, núm. 503, 2001.
- Treviño, C. L. *et al.*, "Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca²⁺ channels in mammalian male germ cells and sperm", en *FEBS Letters*, núm. 563, 2004.
- Vacquier, V. D., "Evolution of gamete recognition proteins", en *Science*, vol. 281, 1998.
- Wood, C. D. *et al.*, "Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm", en *J. Cell Biol.*, vol. 169, 2005.
- Yanagimachi, R., *The Physiology of Reproduction*, Nueva York, Raven, 1994.