

Efectos de la capsaicina en la reacción acrosomal del espermatozoide del erizo de mar *S. purpuratus*

Mario Cortés, Roberto Hidalgo, Mauricio Moreno, Ana Zarak

Resumen:

La fecundación juega un papel importante en la perpetuación de las especies. Una parte fundamental de este proceso es la reacción acrosomal. Esta consiste en cambios de la membrana celular del espermatozoide para la formación de una vesícula, llamada túbulo acrosomal. Por medio de esta, se logra el intercambio de material genético con el óvulo. Estos cambios suceden en la membrana gracias a la apertura de canales iónicos. En el *S. purpuratus*, estos canales son inducidos por principalmente Ca^{+2} , y la gelatina desprendida del gameto femenino. La capsaicina es un compuesto que induce la apertura de canales iónicos, como en los receptores vaniloides de la lengua. Los compuestos capsaicina y el VAmC8 agregados al medio de la reacción acrosomal, en concentraciones de 5 μ l por cada 30 μ l de solución, mostraron inducir un porcentaje mayor de reacción acrosomal, del ~25% y ~20%, respectivamente, y en relación a los controles sin ellos.

Introducción

El problema que presenta la fertilidad tiene dos caras. Por un lado, existe la búsqueda de un método anticonceptivo efectivo al cien por ciento, mientras que también existe la demanda de un proceso efectivo que ayude a la fertilización de parejas que son químicamente compatibles por el pH del medio de fecundación. Parte de este problema ha sido tomado por distintos grupos de investigación alrededor del mundo, comúnmente usando al erizo de mar púrpura, conocido como *S. purpuratus* como sujeto de investigación.

La ventaja de usar este erizo de mar, radica en sus células sexuales, ya sean espermatozoides u óvulos, pues su tamaño es considerablemente más grande que el del humano. Además, presenta la ventaja de que la densidad de espermatozoides por mililitro es de 10^{10} , en una sola descarga que puede variar entre los 4 y 6 ml. El medio en que sucede la fecundación es fácilmente reproducible, ya que se trata de un ambiente externo, el mar. También, a pesar de la distancia evolutiva entre los mamíferos como el humano, y el erizo, tanto los procesos reproductivos como la reacción acrosomal presentan homologías en ambas especies. De este modo, la investigación de los erizos puede ser “traducida” eventualmente al humano cambiando pocos factores. El erizo de mar con el que trabajamos viene de Ensenada, y es conservado en un ambiente controlado en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

En específico, una parte esencial para la fecundación natural, es la formación de la vesícula acrosomal. Este proceso es conocido como Reacción Acrosomal (RA), el cual es inducido a partir de la apertura de canales iónicos. Los canales iónicos son canales de transporte en la membrana celular que regulan el intercambio de material de ambos lados de la célula. Estos son inducidos naturalmente, en el espermatozoide del erizo de mar, por el ion Calcio⁺² del agua de mar. Al abrirse este canal, comienza una serie de procesos que terminarán modificando la estructura de la membrana celular del espermatozoide, para la creación de la vesícula acrosomal. Esta vesícula proporciona el método para la penetración de la pared celular del óvulo y el intercambio de información genética.

La capsaicina es un compuesto que al adherirse a algunos receptores como los vaniloideos, abre canales iónicos en la membrana celular. Esta se encuentra en los chiles de mesa y gracias a este proceso es que se presenta la característica pungente de éstos, pues hay receptores vaniloideos en la lengua. Del mismo modo, hay derivados de la capsaicina como el VAmC8 (8-inductor de canales iónicos del receptor vaniloide) que promueven el mismo tipo de canales. El espermatozoide del erizo tiene receptores que funcionan de la misma manera que los vaniloideos.

Se han hecho investigaciones relacionadas a este tema desde el acercamiento de la interacción iónica entre la vesícula del espermatozoide y el óvulo (Darszon, 2003), y en general el uso del phylum *Echinoidermata* (erizo de mar *S.purpuratus*) para estudios de embriología es comúnmente conocido para la comunidad científica (Wikimedia, 2005). De hecho, esto ha dado origen a que se conozca al óvulo de éste erizo como “el” óvulo, al igual que a su contraparte en el macho. Aún así, los estudios anteriores tienen como fin averiguar como es el intercambio iónico en este animal para formular hipótesis de cómo puede ser en el humano y, lo que se demuestra, es la ayuda esencial del ion sodio (Na^{+2}) en el ambiente del agua del mar, que es lo que promueve la fecundación en el erizo (Liévano, 1994). El transporte iónico entre la membrana y su medio juega un papel sumamente importante pues, sin éste, la reacción acrosomal, (y por lo tanto la fecundación) es imposible. Del mismo modo, hay procesos análogos en el humano.

La capsaicina, al juntarse con el receptor vaniloide, que se encuentra en la punta de los nervios de la lengua, produce la transportación de iones a través de la estructura del nervio. Esta sensación de picor es causada por el flujo de iones, que se ve incrementado sustancialmente al momento que se junta la capsaicina con el receptor vaniloide. Además, se ha investigado que, en concentraciones altas, éste canal iónico se cierra (Churamani 2004).

Por otro lado, no hay ninguna investigación publicada sobre los efectos de la capsaicina en el ambiente de la fecundación. Lo que más se acerca viene del University College of London, donde se hace una vaga referencia a la influencia en los iones de potasio (K^{+}) con receptores de una proteína que se adhiere a la capsaicina. Adicionalmente, en junio del 2002 se publicó un trabajo (Zygmunt et al, 2002) que mencionaba algo relacionado con canales iónicos y THC (Δ -9Tetrahidrocannabinol), el compuesto activo de la marihuana. Éste también activa canales iónicos que son activados comúnmente por la capsaicina en los receptores vaniloideos.

Hipótesis

La capsaicina promueve un mayor porcentaje de reacción acrosomal en los espermatozoides del erizo *S. purpuratus* con respecto a un control sin ella.

Objetivos

Encontrar una sustancia derivada de la capsaicina que aumente considerablemente el porcentaje de reacción acrosomal en el espermatozoide del erizo *S. purpuratus*.

Metodología

La investigación se realizó en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon, en el Departamento de “Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular” en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (IBT UNAM). Nuestra metodología consistió en recolectar espermatozoides del erizo *S. purpuratus* por medio de la inyección de fosfato de potasio. Para lograr esto, primero aprendimos a usar los instrumentos y a manejar los reactivos. Después preparamos una solución de agua de mar completa (AMC), de pH 8.0. La AMC es necesaria para tener un control que active los espermatozoides después de ponerlos a hibernar a bajas temperaturas. Además, provee un ambiente restrictivo para la reacción acrosomal sin gelatina. Este tipo de reacción es importante para verificar que la reacción acrosomal es dependiente de la gelatina, y en su ausencia, disminuye el porcentaje de reacción acrosomal

con respecto a cuando hay gelatina.

Para empezar, buscamos la gelatina del óvulo que nos diera un porcentaje medio (~25%) de reacción acrosomal (RA), con el propósito de averiguar si el porcentaje de RA era afectado positiva o negativamente con los compuestos. Probamos gelatinas de 3 óvulos distintos, e hicimos 3 repeticiones con cada muestra. La reacción acrosomal se cuantifica contando 100 espermatozoides a diferentes profundidades. Para asegurarse que sea una muestra representativa, cada muestra se revisa por 4 personas diferentes. El campo que se analiza no se repite, se revisa de arriba hacia abajo y, en caso de llegar a un borde, o a un campo que no presente espermatozoides, se corre hacia la derecha el portaobjetos lo suficiente para tener un campo que no se trasape con el anterior. Los resultados se van anotando mientras se van contando, hasta llegar a los 100 espermatozoides contados. Esto se hace con cada muestra, de cada compuesto, y a cada concentración, 3 veces.

Con la gelatina que acabamos de conseguir, volvemos a hacer una solución con 50 μL de ella y 250 μL de AMC (ó 300 μL si no se agregará gelatina). Esta se pone a enfriar hasta que alcance los 14° C para después agregar 1, 5, y 10 μM de capsaicina en un caso y VAmC8 en otro, para al final diluir 30 μL de espermatozoides (es una concentración 1:10 μL). Se agitan suavemente durante 2 minutos para formar una mezcla homogénea y se dejan reposar 2 minutos más. En esta fase ya se activan los espermatozoides y durante los últimos 2 minutos ocurre la reacción acrosomal. Al finalizar, se agrega fijador para que se detenga la RA, para posteriormente analizarlo al microscopio. Se pone una gota de la solución resultante en un portaobjetos, bajo un cristal delgado que se adhiere al portaobjetos. A continuación, se agrega una gota de aceite de inmersión y se coloca al microscopio.

Resultados

En nuestros experimentos, encontramos que el control con AMC y gelatina (Figura 1), el porcentaje de RA aumenta significativamente en las dos pruebas. De este modo, en relación al control, la

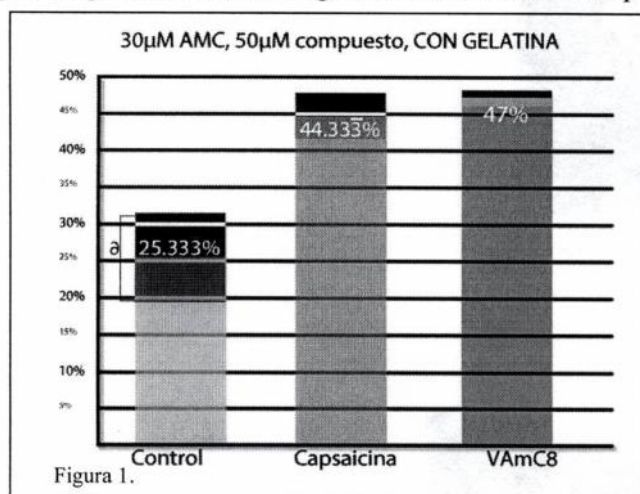
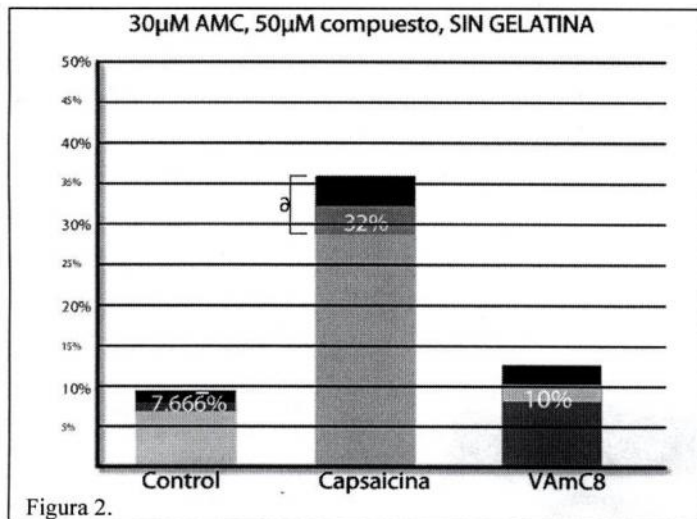


Figura 1.

capsaicina influyó en la reacción acrosomal, aumentando el porcentaje de la reacción acrosomal en un 19.0 ± 10.4 %, mientras que el VAmC8 mostró un aumento del 21.7 ± 5.9 % en relación al control.

En la siguiente prueba, ahora con AMC, pero sin gelatina de óvulo, encontramos un resultado menor que el control y uno mayor. En primer lugar (figura 2) encontramos que el control disminuye hasta un 7.7 ± 2.3 %. Desde este punto de comparación, encontramos que la capsaicina aumenta el porcentaje de reacción acrosomal un 24.4 ± 8.9 %, y el VAmC8 no presenta una diferencia

significativa al solamente aumentar el porcentaje de la reacción un 2.4 ± 3.6 %. Estos resultados lo podemos afirmar con un 95% de confiabilidad.



Conclusión

La capsaicina muestra un aumento en el porcentaje de la RA en ausencia de gelatina. Este aumento se muestra significativo en las tablas de significancia. En un ambiente actual de la vida (con gelatina), también muestra un aumento significativo. Mientras que en ausencia de gelatina, el VAmC8 no parece tener tanta influencia como la capsaicina en el comportamiento de la RA, muestra un aumento en el porcentaje de la RA en un entorno de la vida real, donde se presenta gelatina como en el ambiente natural del *S. purpuratus*, por lo que consideramos que ambos compuestos colaboran a un aumento del porcentaje de la reacción acrosomal. Más adelante, éstos resultados serán útiles en la investigación del espermatozoide del erizo de mar *S. purpuratus* en el grupo de investigación de esta línea del Dr. Darszon y también en la investigación de todo el departamento sobre los procesos de la fecundación que se lleva a cabo en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del IBT de la UNAM.

Bibliografía:

- Darszon, (2003). “*Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm*”: J. Physiol **546**: 89-100.
- Wikimedia, (2005) “*Sea Urchin*”: Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_urchin. Visitada el 4 de febrero, 2005
- Lievano, A. (1994) “*El espermatozoide como célula excitable*” Ciencia y Desarrollo **119**: 50 – 58.
- Zygmunt, David A. Andersson, and Edward D. Högestätt, (2002), “*9-Tetrahydrocannabinol and Cannabinol Activate Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves via a CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor-Independent Mechanism*”: The Journal of Neuroscience **22(11)**: 4720-47.
- Churamani (2004), Dickinson, G., Patel, S., “*Regulation of NAADP Binding by Phospholipids*”: Biochemical Journal Immediate Publication pp. 4 - <http://www.biochemj.org/bj/imps/pdf/BJ20041990.pdf>. Visitada el 1 de febrero, 2005.